



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO REIS VELLOSO – PARNAÍBA  
BACHARELADO EM BIOMEDICINA

VINÍCIUS MORAES DOS SANTOS

**VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO *Chikungunya virus* (CHIKV) UTILIZANDO  
MÉTODOS SOROLÓGICOS E MOLECULARES E INVESTIGAÇÃO DO *Mayaro virus*  
(MAYV) POR RT-PCR, NO ESTADO DO PIAUÍ.**

PARNAÍBA- PI

2018

VINÍCIUS MORAES DOS SANTOS

**VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO *Chikungunya virus* (CHIKV) UTILIZANDO MÉTODOS SOROLÓGICOS E MOLECULARES E INVESTIGAÇÃO DO *Mayaro virus* (MAYV) POR RT-PCR, NO ESTADO DO PIAUÍ.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Piauí, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira.

PARNAÍBA- PI  
2018

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba  
Serviço de Processamento Técnico

S237v Santos, Vinícius Moraes dos.

Vigilância epidemiológica do *Chikungunya virus* (CHIKV) utilizando métodos sorológicos e moleculares e investigação do *Mayaro virus* (MAYV) por RT-PCR, no estado do Piauí. [manuscrito] / Vinícius Moraes dos Santos. – 2018.

75 f.

Impresso por computador (printout).  
Monografia (Bacharel em Biomedicina) – Universidade Federal do Piauí, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira.

1. *Chikungunya virus* (CHIKV). 2. *Mayaro virus* (MAYV). 3. Monitoramento Epidemiológico - Piauí. 4. Medicina Preventiva. I. Título.

CDD: 616.9

VINÍCIUS MORAES DOS SANTOS

**VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO *Chikungunya virus* (CHIKV) UTILIZANDO  
MÉTODOS SOROLÓGICOS E MOLECULARES E INVESTIGAÇÃO DO *Mayaro virus*  
(MAYV) POR RT-PCR, NO ESTADO DO PIAUÍ.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
à Universidade Federal do Piauí como  
requisito obrigatório para obtenção do título  
de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira

APROVADO EM \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira (Orientador)  
Universidade Federal do Piauí

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira  
Universidade Federal do Piauí

---

Prof. Me. Thiago Nobre Gomes  
Universidade Federal do Piauí

“Eu te louvarei, porque de um modo assombroso, e tão maravilhoso fui feito;”  
*Salmo 139, 14.*

## DEDICATÓRIA

Dedico essa conquista a todos os meus familiares que estiveram comigo desde o início dessa trajetória escolar e acadêmica e em especial, à minha mãe, principal incentivadora.

## AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, por me ter concedido o dom mais importante, a vida. Por ter me inspirado desde cedo, a vocação pela vida e pelas ciências da saúde.

A Nossa Senhora da Conceição, exemplo de educadora, mãe e amor pelo conhecimento, pelas várias graças concedidas.

Aos meus pais, por terem sempre se esforçado em proporcionar uma boa educação à mim e às minhas irmãs. Aos meus irmãos Vitória, Ana Beatriz e Diogo pelas experiências proporcionadas e momentos incríveis compartilhados.

Agradeço também aos meus tios e avó maternos. Vocês contribuíram e muito na minha formação afetiva, reflexiva e também intelectual.

Aos colegas que fiz nas escolas pelas quais passei, em especial ao Centro de Ensino Cândido Mendes, primeira escola e que carrega em seu nome, um exemplo de intelectual e de profissional, *Studio et Labore*; e também ao Colégio Imaculada Conceição, onde grande crescimento foi proporcionado e a paixão pela saúde intensificada. Estendo os agradecimentos também a cada professor e funcionário dessas escolas, que muitas das vezes, transmitiram conhecimentos essenciais e que dificilmente se encontram em livros.

Aos colegas de curso, que me permitiram e se permitiram viver e compartilhar desta fase muito importante em nossas vidas.

Aos professores, que desde os períodos iniciais se mostraram atenciosos e dedicados com a função de formar bons profissionais. Lembro aqui, da preocupação e atenção da professora Dr<sup>a</sup>. France Keiko Nascimento Yoshioka. Ao professor Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos, meu primeiro exemplo de pesquisador na graduação.

Ao Dr. Giovanni Rebouças Pinto, pelo exemplo de humildade e pelo fascínio que provocou em mim ao me contar um pouco de sua história. E ainda mais, por permitir dar a minha opinião em assuntos educacionais, onde, tão somente, sou um iniciante nessa trajetória já trilhada por ele e com sucesso.

À professora Dr<sup>a</sup>. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira por ser exemplo de amor à microbiologia e à virologia. Muito me alegrei quando percebi que a pessoa que ministraria a disciplina de virologia era, igualmente, apaixonada por ela e desde a educação básica, assim como eu. Obrigado por ter aberto as portas do Laboratório BIOMIC para que eu pudesse iniciar meus estudos nessa ciência.

Ao Dr. Gustavo Portela Ferreira, por ter oportunizado o seguimento nos meus estudos. Por ser exemplo de perseverança na virologia. Certa vez eu li que para ser um virologista, tem que ter perseverança e você, certamente é e será sempre um modelo para mim.

Aos amigos que conheci no laboratório e que, por certo, estarão sempre em meus pensamentos. Thiago Gomes, Felipe Daniel, Silveny, Daniela, Naiany, Julianna e Vanessa

Poleana por serem exemplo de responsabilidade e de pesquisadores. À Emanuela Lima que foi a pessoa com quem mais convivi diretamente e que teve grande importância no meu aprendizado. Muito Obrigado!

Aos demais amigos colegas do laboratório e estudantes de graduação, Lorena, Mariella, Dacylla, Philipe e Jaiane por tornarem mais fácil a rotina.

Enfim, muito obrigado a todos que fizeram parte dessa trajetória até aqui!



## RESUMO

*Chikungunya virus* (CHIKV) é um arbovírus do gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*, responsável por causar uma doença artrálgica incapacitante. Desde o seu isolamento na década de 1950 provocou surtos esporádicos em países africanos e asiáticos, mas a partir do ano de 2004 despertou grande preocupação e interesse das autoridades de Saúde Pública mundial após a ocorrência de vários surtos e epidemias com grande número de infecções na África, Ásia e ilhas do Oceano Índico. Na América, os primeiros casos autóctones ocorreram em 2013, e nos anos seguintes foi o responsável por milhões de infecções em todo o continente, com destaque para o Brasil. *Mayaro virus* (MAYV), um outro alfavírus artrítogênico, é endêmico das Américas especialmente, na região da Floresta Amazônica. É antígenicamente relacionado ao CHIKV e assim como ocorreu com este, pode se disseminar pelo país, pois possui um grande potencial de urbanização devido à sua capacidade de transmissão por mosquitos antropofílicos do gênero *Aedes*. Baseado nisso, o presente estudo objetivou empregar técnicas moleculares para quantificar a positividade do CHIKV no Estado do Piauí e investigar uma possível circulação do MAYV. Adicionalmente, dados de testes sorológicos realizados em serviços de saúde foram analisados. Foram coletadas 347 amostras de soro de pacientes com suspeita de infecção arboviral em todo o ano de 2017. Destas, 184 amostras foram positivas para CHIKV, sendo 170 positivas por sorologia, 10 através de RT-PCR e 4 na combinação de ambos os métodos. A maior incidência da infecção ocorreu em mulheres (73,37%) e em indivíduos com idade entre 20 e 49 anos (54,9%). Em relação aos sintomas clínicos, os mais prevalentes foram a febre e a artralgia, acompanhados por cefaleia, mialgia e exantema. Manifestações atípicas, como sinais hemorrágicos, foram vistas em 10,33% dos pacientes, uma frequência maior que em outros surtos vistos no Oceano Índico e na América. O acompanhamento clínico dos pacientes positivos para a detecção do RNA do CHIKV mostrou que aproximadamente 60% deles evoluíram para a fase crônica da infecção, que se caracterizou pela persistência de artralgia em diferentes articulações do corpo resultando em impacto na qualidade de vida desses pacientes. Adicionalmente, uma investigação do MAYV através de RT-PCR foi realizada, mas não foi obtido nenhum isolado. No entanto, em um trabalho paralelo do laboratório, um caso sugestivo de co-infecção por MAYV e DENV foi identificado. Em resumo, os resultados obtidos demonstram a importância da vigilância laboratorial na caracterização do perfil clínico-epidemiológico de arbovírus recém introduzidos no Estado (CHIKV), bem como o papel que métodos mais precisos como a RT-PCR desempenham nesse processo. Além disso, o emprego desses novos métodos permite uma investigação mais precisa de novos arbovírus, auxiliando desse modo, a Vigilância Epidemiológica estadual no monitoramento da entrada e circulação viral e na elaboração de novas estratégias de enfrentamento à essas infecções.

**Palavras-chave:** CHIKV; MAYV; RT-PCR; Monitoramento Epidemiológico; Piauí.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Organização genômica dos <i>Alphavirus</i> em geral .....	20
<b>Figura 2.</b> Organização genômica do MAYV mostrando o <i>Frameshift</i> que resulta na proteína <i>TF</i> .....	21
<b>Figura 3.</b> Distribuição geográfica mundial dos genótipos do CHIKV .....	24
<b>Figura 4.</b> Rota de inoculação e disseminação do CHIKV no organismo .....	27
<b>Figura 5.</b> Distribuição espacial do MAYV pela América Latina .....	30
<b>Figura 6.</b> Testes laboratoriais usados para o diagnóstico da infecção pelo CHIKV de acordo com o período da doença .....	33
<b>Figura 7.</b> Principais manifestações clínicas observadas em pacientes com infecção pelo CHIKV confirmada no ano de 2017 .....	44
<b>Figura 8.</b> Amostras positivas para a presença do RNA do CHIKV .....	46
<b>Figura 9.</b> Padronização do protocolo de RT-PCR descrito por Bronzoni e colaboradores (2005) para detecção do MAYV através do gene <i>nsP1</i> .....	52
<b>Figura 10.</b> Padronização do protocolo de RT-PCR descrito por Talarmin e colaboradores (1998) para detecção do MAYV através de uma região de junção dos genes <i>E3/E2</i> .....	54
<b>Figura 11.</b> Padronização do protocolo de RT-PCR que foi desenvolvido no laboratório e descrito por Barros (2018) para detecção do MAYV baseado no gene <i>E1</i> .....	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sequência dos iniciadores descritos por Kumar e colaboradores (2007) utilizados para detecção do CHIKV com base no gene <i>E1</i> .....	37
<b>Tabela 2.</b> Sequência dos iniciadores descritos por Porter e colaboradores (2004) utilizados para detecção do CHIKV com base no gene <i>E2</i> .....	38
<b>Tabela 3.</b> Sequência dos iniciadores descritos por Bronzoni e colaboradores (2005) utilizados para detecção do MAYV com base no gene <i>nsP1</i> .....	39
<b>Tabela 4.</b> Sequência dos iniciadores descritos por Talarmin e colaboradores (1998) utilizados para detecção do MAYV com base numa região de interseção dos genes <i>E3/E2</i> .....	40
<b>Tabela 5.</b> Sequência dos iniciadores desenhados no laboratório e descritos por Barros (2018) utilizados para detecção do MAYV com base no gene <i>E1</i> .....	40
<b>Tabela 6.</b> Descrição das amostras que foram positivas nos testes moleculares para CHIKV .....	47
<b>Tabela 7.</b> Descrição da evolução clínica e do tempo de persistência das manifestações de pacientes com a infecção pelo CHIKV confirmada por RT-PCR .....	49

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**BIOMIC** – Laboratório de Bioquímica e Biologia de Micro-organismos e Plantas

**cDNA** – DNA complementar

**CHIKV** – *Chikungunya virus*

**DC-SIGN** – Molécula de adesão intracelular 3 englobadora não-integrina específica de células dendríticas (do inglês “*Dendritic-Cell-Especific ICAM3-Grabbing No-integrin*”)

**DENV** – *Dengue virus*

**dNTP** – Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

**ECSA** – Genótipo Leste/Centro/Sul Africano (do inglês “East/Central/South African”)

**ELISA** – Ensaio Imunoabsorvente ligado à enzima (do inglês “Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay”)

**GelRed** – Gel corante de ácido nucleico

**IFN** – Interferon

**IgM** – Imunoglobulina M

**IgG** – Imunoglobulina G

**IOL** – Linhagem do Oceano Indico (do inglês “Indian Ocean Lineage”)

**KB** – Kilobases

**LACEN – PI** – Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Costa Alvarenga, Piauí

**MAYV** – *Mayaro virus*

**MMLV-RT** – Enzima com atividade de Transcriptase Reversa (do inglês “Moloney Murine Leukemia Virus - Reverse Transcriptase”)

**nsP** – Proteína não estrutural (do inglês “Non Structural Protein”)

**pb** – Pares de base

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase (do inglês “Polymerase Chain Reaction”)

**RT-PCR** – Transcrição reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês “Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction”)

**TCLE** – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Waf** – Genótipo Oeste Africano (do inglês “West African”)

**WNV** – *West Nile virus*

**ZIKV** – *Zika virus*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Arbovírus</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2 <i>Alphavirus</i></b> .....	<b>19</b>
<b>2.2.1 <i>Chikungunya virus</i></b> .....	<b>22</b>
2.2.1.1 Epidemiologia .....	23
2.2.1.2 Diversidade Genética .....	25
2.2.1.3 Patogênese e Aspectos Clínicos .....	26
<b>2.2.2 <i>Mayaro virus</i></b> .....	<b>29</b>
2.2.2.1 Epidemiologia .....	29
2.2.2.2 Diversidade Genética .....	31
2.2.2.3 Modos de Transmissão .....	31
2.2.2.4 Patogênese e Aspectos Clínicos .....	32
<b>2.3 Diagnóstico Laboratorial do CHIKV e do MAYV</b> .....	<b>32</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
3.1 Objetivo Geral .....	35
3.2 Objetivos Específicos .....	35
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>36</b>
4.1 Aspectos Éticos e Legais .....	36
4.2 Coleta de Amostras e Caracterização do Perfil Clínico-Epidemiológico .....	36
4.3 Extração de RNA Viral seguida por Transcrição Reversa (RT) .....	36
4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	37
4.4.1 PCR para amplificação do gene <i>E1</i> de CHIKV .....	37
4.4.2 PCR para amplificação do gene <i>E2</i> de CHIKV .....	38
4.5 Padronização de reações para detecção de MAYV .....	38
4.5.1 Padronização de reação para amplificação dos gene <i>nsP1</i> de MAYV .....	39
4.5.2 Padronização de reação para amplificação da região de junção dos genes <i>E3/E2</i> de MAYV .....	40
4.5.3 Padronização de reação para detecção do gene <i>E1</i> de MAYV .....	40
4.6 Visualização dos Produtos Amplificados .....	41
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>59</b>

**ANEXO I .....72**  
**ANEXO II .....74**  
**ANEXO III .....75**

## 1 INTRODUÇÃO

*Chikungunya virus* (CHIKV) é um arbovírus pertencente ao gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*. Ele foi identificado pela primeira vez em 1952, na Tanzânia e a partir desse momento, ocasionou surtos esporádicos em países africanos e asiáticos nas cinco décadas seguintes (BURT et al., 2017; KOSASIH et al., 2013). No entanto, após uma epidemia na costa leste do Quênia no ano de 2004, observou-se uma ampla disseminação do CHIKV em vários países da África, ilhas do Oceano Índico e Ásia provocando surtos de magnitude sem precedentes (STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009; THIBERVILLE et al., 2013a; WEAVER; REISEN, 2010), e que teve reflexos na Europa (REZZA et al., 2007) e Estados Unidos (LANCIOTTI et al., 2007) com os primeiros casos importados de CHIKV.

Nas Américas, o primeiro registro de transmissão autóctone do vírus ocorreu no final do ano de 2013, na ilha caribenha de Saint Martin (LEPARC-GOFFART et al., 2014; WEAVER, 2014) e no ano seguinte, os primeiros casos autóctones foram detectados no Brasil, nos Estados do Amapá e Bahia (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014; NUNES et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2015). Desde então, um aumento exponencial no número de casos suspeitos e/ou confirmados tem sido relatado em vários Estados brasileiros, incluindo o Piauí, com impacto direto nos indicadores de morbidade (BARROS, 2018; BRASIL, 2017; BRASIL, 2018; CARDOSO, 2017; COSTA, M. et al., 2017; CUNHA et al., 2017; SOUZA et al., 2017).

Outro patógeno pertencente ao gênero *Alphavirus*, o *Mayaro virus* (MAYV) também exhibe importância clínico-epidemiológica no continente americano. É endêmico das Américas Central e do Sul, principalmente, na área da Bacia Amazônica e áreas vizinhas (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018; AZEVEDO et al., 2009; HALSEY et al., 2013). No Brasil, as maiores evidências de sua circulação estão nas regiões Norte e Centro-Oeste, com destaque para o Estado de Goiás (ABAD-FRANCH et al., 2012; AZEVEDO et al., 2009; BRUNINI et al., 2017; MOURÃO et al., 2012; MOURÃO et al., 2015; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2015; RODRÍGUEZ-MORALES et al., 2017; ZUCHI et al., 2014).

No entanto, em dados divulgados pelo Ministério da Saúde no ano de 2016, um possível caso de infecção por MAYV foi notificado na Bahia, região Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Essa informação merece ser vista com atenção por pesquisadores e autoridades de saúde uma vez que, o MAYV produz sintomas clínicos semelhantes aos do DENV, ZIKV e CHIKV, arbovírus que sabidamente circulam na região Nordeste (CARDOSO et al., 2015), além de ter uma capacidade comprovada para circular silenciosamente durante surtos de outros arbovírus (ZUCHI et al., 2014).

Estes dois vírus fazem parte do mesmo complexo antigênico e provocam doenças com uma sintomatologia semelhante. Elas se caracterizam, na fase aguda, por febre, cefaleia, mialgia, dor retro-orbitária e poliartralgia, sendo este, o sintoma mais expressivo dessas infecções, e que pode persistir por vários anos caracterizando a fase crônica (BURT et al.,

2012; BRUNINI et al., 2017; ESPOSITO; FONSECA, 2017; STAPLES; FISCHER, 2014; WEAVER et al., 2018; ZUCHI et al., 2014).

No Piauí, as arboviroses são um problema antigo para a Saúde Pública. É endêmico para o *Dengue virus* (DENV) desde a década de 1990 (CASTRO et al., 2003) e recentemente, teve a co-circulação dos quatro sorotipos virais detectada, caracterizando-o como hiperendêmico (GARCÊS, 2016; SANTOS, 2013; VALE, 2015). Além disso, outros arbovírus como o *West Nile virus* (WNV), CHIKV e *Zika virus* (ZIKV) também foram identificados (BARROS, 2018; BRASIL, 2017; CARDOSO, 2017; SESAPI, 2016; VIEIRA et al., 2015). Vale notar que, a co-circulação de vários arbovírus em uma mesma área geográfica prejudica a identificação de arbovírus menos comuns uma vez que, eles provocam uma sintomatologia semelhante e que o diagnóstico é na maioria dos casos, baseado nos sintomas clínicos (FURUYA-KANAMORI et al., 2016; MORRISON, 2014).

Assim, com base no caráter emergente e reemergente do CHIKV nos últimos anos em regiões endêmicas ou não-endêmicas para o DENV de vários países e territórios do mundo, inclusive no Brasil, com destaque para a região Nordeste e numa possível circulação silenciosa do MAYV durante surtos de outras arboviroses, existe a necessidade de uma melhor compreensão da epidemiologia desses agentes para o desenvolvimento de sistemas de vigilância e de controle funcionais (ABAD-FRANCH et al., 2012; AZEVEDO et al., 2009; BRASIL, 2017; FURUYA-KANAMORI et al., 2016; NSOESIE et al., 2016; ZUCHI et al., 2014).

Tendo em vista isso, a utilização ou até mesmo o desenvolvimento de métodos laboratoriais mais sensíveis e específicos, como a RT-PCR, permite um diagnóstico mais seguro e confiável de infecções arbovirais, considerando a difícil diferenciação clínica entre estas. Além disso, permitem uma posterior análise da sequência genética do vírus circulante em uma dada região geográfica, possibilitando a caracterização em nível de genótipo ou linhagem e uma possível correlação com a gravidade da doença (BRONZONI et al., 2005; EDWARDS et al., 2007; PFEFFER et al., 2002).

Adicionalmente, no caso das infecções por alfavírus artritogênicos, como CHIKV e o MAYV, a detecção precoce facilita o manejo adequado dos pacientes podendo assim, reduzir a carga de doença grave atípica e artrítica crônica do CHIKV, por exemplo (YACTAYO et al., 2016) e o desenvolvimento de métodos moleculares altamente específicos seria muito útil na investigação da epidemiologia do MAYV uma vez que, devido à reatividade cruzada com alfavírus relacionados mostrada em testes sorológicos, há uma subnotificação de casos dessa infecção (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018).



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Arbovírus

Arbovírus é um termo genérico derivado do inglês “*arthropod-borne viruses*”, que designa um grupo de vírus transmitidos por vetores artrópodes, como mosquitos e carrapatos, e que necessitam destes para completar parte do seu ciclo replicativo (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). Estima-se que possa existir mais de 500 espécies de arbovírus, sendo mais de 150, relacionadas com o desenvolvimento de doenças em humanos (DONALISIO; FREITAS; VON ZUBEN, 2017; MUSSO; GUBLER, 2016; SILVA JÚNIOR et al., 2018).

Atualmente, os arbovírus com maior importância para a Saúde Pública estão agrupados em cinco famílias virais: *Bunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (CASSEB et al., 2013; DONALISIO; FREITAS; VON ZUBEN, 2017; LIANG; GAO; GOULD, 2015; WEAVER; REISEN, 2010). Eles encontram-se distribuídos geograficamente por quase todos os continentes, porém sua ocorrência tem sido relatada principalmente, em regiões de clima tropical e subtropical (LIANG; GAO; GOULD, 2015; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). No entanto, alguns arbovírus como o CHIKV, podem se adaptar a novas espécies de mosquitos e assim, se disseminar para áreas temperadas (REZZA et al., 2007; TSETSARKIN et al., 2007).

Nos últimos anos, foi possível observar uma ampla propagação de diferentes arbovírus em vários lugares do mundo (DONALISIO; FREITAS; VON ZUBEN, 2017; STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009; WEAVER; REISEN, 2010). Entre os vários fatores que contribuíram para essa disseminação, estão as mudanças climáticas, o desmatamento, a urbanização e o aumento do tráfego aéreo internacional (BURT et al., 2017; CLETON et al., 2015; DONALISIO; FREITAS; VON ZUBEN, 2017; FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014; GOULD et al., 2017; LIMA-CÂMARA, 2016; MOTA et al., 2016).

Além desses, um outro fator também pode contribuir na disseminação arboviral: as variações genéticas do vírus (MURUGAN; SATHISHKUMAR, 2016; NICHOL; ARIKAWA; KAWAOKA, 2000). Variações genéticas, como as mutações, podem influenciar a distribuição viral ao aumentar a virulência e/ou facilitar a adaptação à novos vetores, conforme visto com o CHIKV, onde uma mutação numa proteína de envelope foi associada com uma maior infectividade do CHIKV em mosquitos *Aedes albopictus*, os mosquitos mais predominantes na ilha Reunião e os principais responsáveis pela disseminação do CHIKV pelo Oceano Índico, Sudeste Asiático e Europa (CAGLIOTI et al., 2013; SCHUFFENECKER et al., 2006; TSETSARKIN et al., 2007).

Apesar de serem encontrados em muitos países, a maior diversidade de arbovírus do mundo está localizada no Brasil (CASSEB et al., 2013). Até 2013, 210 tipos diferentes tinham sido identificados e desse total, mais de 30 haviam sido implicados em infecções humanas

(CASSEB et al., 2013). No cenário epidemiológico atual, vários desses agentes estão em circulação e novos foram introduzidos, com destaque para aqueles pertencentes aos gêneros *Flavivirus* da família *Flaviviridae* e *Alphavirus* da família *Togaviridae* (DONALISIO; FREITAS; VON ZUBEN, 2017; MOTA et al., 2016; VIEIRA et al., 2015).

A maioria das infecções arbovirais são assintomáticas, no entanto, o CHIKV e o ZIKV apresentam taxas maiores de indivíduos sintomáticos (WEAVER et al., 2018). Nas infecções sintomáticas, observa-se uma similaridade de sintomas entre os diferentes arbovírus. No geral, os pacientes apresentam uma doença febril indiferenciada que pode ou não ser acompanhada por cefaleia, vômitos, dor retro-orbitária, exantema com ou sem prurido e artralgia, ou ainda, apresentar manifestações clínicas mais graves como complicações neurológicas e hemorrágicas (BRONZONI et al., 2005; DONALISIO; FREITAS; VON ZUBEN, 2017; ESPOSITO; FONSECA, 2017; GUZMAN et al., 2016; LIMA-CÂMARA, 2016; MUSSO; GUBLER, 2016; SCHWARTZ; ALBERT, 2010).

Em relação ao tratamento, não existe um antiviral específico para as pessoas com alguma infecção arboviral, mas existe atualmente várias linhas de pesquisas para o desenvolvimento dessas drogas. Uma das estratégias mais promissoras e que pode ter um impacto clínico em curto prazo é o redirecionamento de drogas que já são utilizadas para outras doenças. Essa estratégia já se mostrou útil para o ZIKV. Sofosbuvir, um medicamento aprovado para uso clínico em pacientes com Hepatite C, foi capaz de inibir a replicação do ZIKV (SACRAMENTO et al., 2017). No entanto, na maioria dos casos clínicos o tratamento ainda se baseia na utilização de medidas que visam a redução dos sintomas. Entre essas medidas estão a reposição de fluidos, o uso de analgésicos, antipiréticos e o repouso absoluto (LIMA-CÂMARA, 2016; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; MOTA et al., 2016).

Assim, e considerando os vários fatores relacionados às arboviroses como a diversidade de arbovírus existente (CASSEB et al. 2013), a similaridade dos sintomas entre eles e também entre os demais agentes causadores de doença febril aguda indiferenciada (BRONZONI et al., 2005; GALÁN-HUERTA et al 2018), a co-circulação de arbovírus em uma mesma área geográfica (CLETON et al. 2015; FURUYA-KANAMORI et al., 2016) e a inexistência de vacinas e drogas antivirais para a maioria das arboviroses, faz-se necessário a adoção de medidas de prevenção que reduzam a morbidade e o impacto econômico e social causados por essas doenças (LIANG; GAO; GOULD, 2015).

Dentre as medidas que podem ser utilizadas para atingir os objetivos acima citados, estão o desenvolvimento e o emprego de programas de controle vetorial eficientes, educação sanitária contínua das populações de áreas de risco, uso de repelentes, vacinação (no caso da Febre Amarela) e vigilância laboratorial. Além disso, a capacitação de médicos profissionais da saúde tem que ser promovida a fim de auxiliar no diagnóstico diferencial e no correto manejo de pacientes (BRONZONI et al., 2005; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014)

## 2.2 *Alphavirus*

*Alphavirus* é um gênero pertencente à família *Togaviridae* que inclui 31 espécies de vírus reconhecidas (MOTA et al., 2016; RUPP et al 2015;). Esses vírus possuem uma ampla gama de hospedeiros incluindo pássaros, répteis, roedores, peixes, anfíbios, equinos e primatas não-humanos (ATKINS, 2013; MOTA et al., 2016; MURRAY; ROSENTHAL; PFALER, 2010). O ser humano também é um hospedeiro e vários desses vírus representam sérias ameaças à saúde humana em muitas áreas do planeta (COUDERC; LECUIT, 2015; STRAUSS; STRAUSS, 1994).

Os membros do gênero *Alphavirus* são agrupados em complexos antigênicos (ZUCKERMAN et al., 2004). Inicialmente, essa classificação foi feita baseada em reações sorológicas e o resultado foi a identificação de sete complexos: Complexo do vírus da Floresta Semliki (SFV), Floresta Barmah (BFV), Ndumu (NDUV), Middelburg (MIDV), Encefalite Equina Venezuelana (VEEV), Encefalite Equina do Leste (EEEV) e Encefalite Equina do Oeste (WEEV) (GOULD et al., 2010; WEAVER et al., 2012). No entanto, com a descoberta de mais espécies e com o posterior emprego de ferramentas para a análise das sequências genômicas pôde-se descobrir mais um complexo, o complexo do vírus Trocara (TROCV) (GOULD et al., 2010; POWERS et al., 2001; WEAVER et al., 2012).

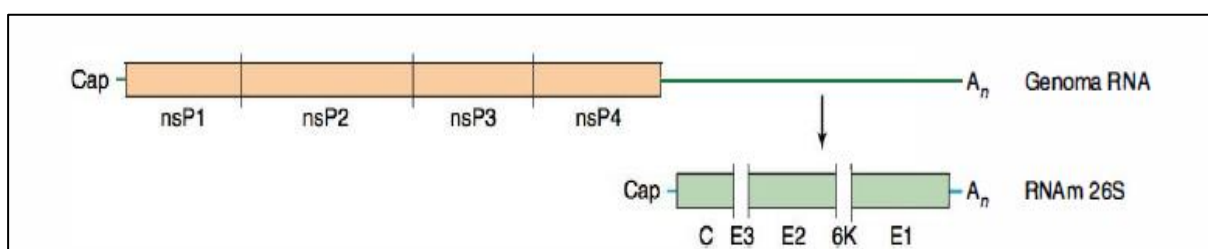
Além da subdivisão em complexos, os alfavírus também podem ser classificados em Alfavírus do Velho Mundo e Alfavírus do Novo Mundo com base na sua origem geográfica e na doença clínica provocada (MOTA et al., 2016; RYMAN; KLIMSTRA, 2008; SCHWARTZ; ALBERT, 2010). Os alfavírus do Velho Mundo são responsáveis por causar uma doença artrítica que pode persistir por anos nos indivíduos acometidos, enquanto os alfavírus do Novo Mundo causam uma doença que se caracteriza por encefalite e que representa uma grave ameaça à saúde humana e também animal (ASSUNÇÃO-MIRANDA; CRUZ-OLIVEIRA; POIAN, 2013; SCHWARTZ; ALBERT, 2010; SUHRBIER; JAFFAR-BANDJEE; GASQUE, 2012; WEAVER et al., 2012).

Estruturalmente, os vírus pertencentes ao gênero *Alphavirus* são pequenos, envelopados e medem cerca de 65–70 nm de diâmetro (STRAUSS; STRAUSS, 1994; ZUCKERMAN et al., 2004). Possuem um capsídeo icosaédrico composto por 240 monômeros da proteína de capsídeo que formam uma estrutura quaternária de simetria T=4 e um envelope lipídico que contém 80 espículas proteicas formadas por trímeros de heterodímeros das glicoproteínas de envelope *E1* e *E2* que também apresentam essa simetria (CHENG et al., 1995; GAROFF; SJÖBERG; CHENG, 2004). Essa proporção equivalente entre a quantidade de proteína do capsídeo e a quantidade das glicoproteínas de envelope (CHENG et al., 1995) é importante para a montagem da partícula viral (GOULD et al., 2010).

O genoma dos alfavírus consiste de uma molécula de RNA fita simples, senso-positivo com tamanho entre 11kb e 12 kb, com um cap na extremidade 5' e uma cauda poli-A na

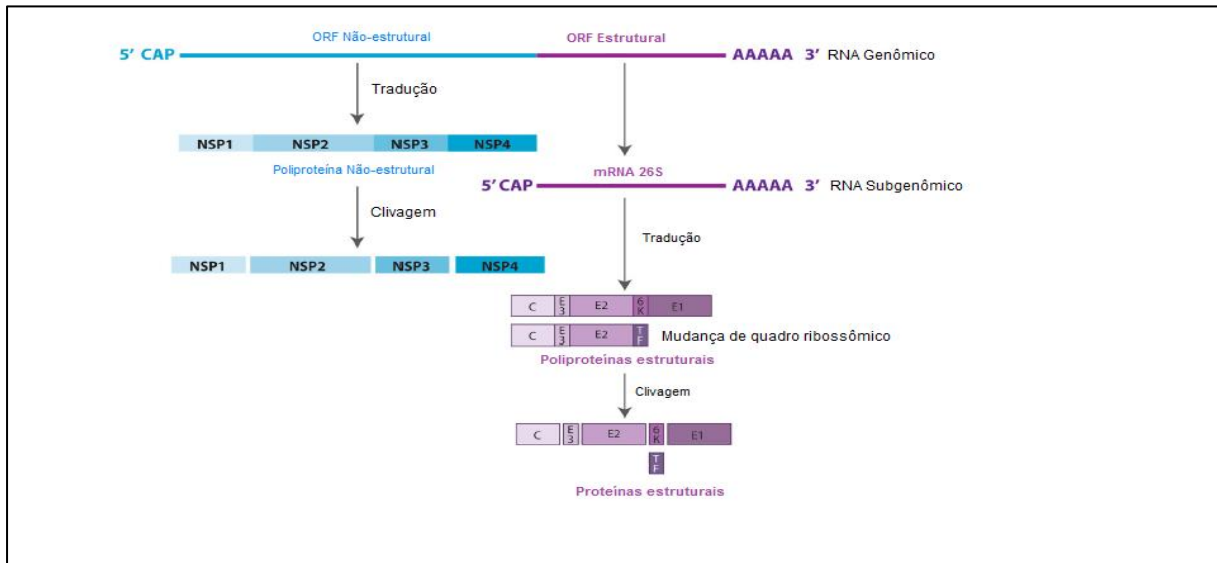
extremidade 3' (LEUNG; NG; CHU, 2011; MOTA et al., 2016; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010; STRAUSS; STRAUSS, 1994; ZUCKERMAN et al., 2004). Este genoma possui duas *Matrizes de Leitura Abertas*, ORFs (do inglês *Open Reading Frames*), que codificam duas poliproteínas precursoras, uma não estrutural e uma estrutural, (Figura 1) (BROOKS et al., 2014; STRAUSS; STRAUSS, 1994).

A ORF não-estrutural pode codificar até duas poliproteínas precursoras, nsP123 ou nsP1234 dependendo do vírus, que após serem clivadas por proteases virais e do hospedeiro geram quatro proteínas não-estruturais denominadas nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4. Estas proteínas fazem parte do complexo de transcrição e replicação de alfavírus (GOULD et al., 2010; REMENYI et al., 2018; STRAUSS; STRAUSS, 1994). A ORF estrutural gera as proteínas estruturais denominadas Capsídeo (C), do Envelope (*E1*, *E2* e *E3*) e no peptídeo *6K* após a clivagem da poliproteína originada do RNA mensageiro subgenômico 26S (BROOKS et al., 2014; MOTA et al., 2016; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010; PULMANAUSAHAKUL et al., 2011).



**Figura 1.** Organização genômica dos *Alfavírus*. Fonte: Adaptado de Brooks et al., 2014.

Em alguns casos, além da proteína *6K*, alguns alfavírus como o CHIKV e o MAYV, também podem expressar a proteína *TF* (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018; REMENYI et al., 2018; SILVA; DERMODY, 2017), conforme pode ser visto na Figura 2. Essa proteína é expressa quando ocorre um deslocamento do quadro de leitura (Frameshift) da proteína *6K*, uma vez que elas compartilham o mesmo sítio amino-terminal (N-terminal), mas diferem na sua extremidade carboxi-terminal (C-terminal) (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018; SILVA; DERMODY, 2017).



**Figura 2.** Organização Genômica do MAYV. Assim como o CHIKV e outros alfavírus, o MAYV apresenta a proteína *TF*, resultante do frameshift da proteína *6K*. Fonte: Adaptado de Acosta-Ampudia et al., 2018.

Dentre as proteínas estruturais, as glicoproteínas de envelope *E1* e *E2* apresentam grande importância, pois participam do processo de ligação ao receptor, fusão e indução da resposta imune (MUKHOPADHYAY et al., 2006; STRAUSS; STRAUSS, 1994). Além disso, os genes que codificam as glicoproteínas *E1* e *E2* são os determinantes genéticos virais associados com o salto entre espécies e o surgimento de alfavírus em novos ciclos mosquito-humano, como o ocorrido com a linhagem do Oceano Índico (IOL) do CHIKV, originada a partir de uma mutação na proteína *E1* de uma estirpe do genótipo ECSA, que se adaptou a um novo mosquito vetor, o *Aedes albopictus* (COFFEY et al., 2013; PULMANAUSAHAKUL et al., 2011; SCHUFFENECKER et al., 2006; TSETSARKIN et al., 2007).

A replicação dos alfavírus ocorre tanto em vertebrados como em invertebrados (SOLIGNAT et al., 2009; STRAUSS; STRAUSS, 1994). O processo, no geral, começa com a ligação das glicoproteínas de envelope a um receptor desconhecido da célula hospedeira. No entanto, alguns receptores já foram identificados na infecção por alguns destes vírus, como o DC-SIGN (Molécula de Adesão Intercelular 3 englobadora não-integrina específica de Células Dendríticas, do inglês Dendritic-Cell-Specific ICAM3-grabbing non-integrin) para o *Sindbis virus* (SINV); Um receptor laminina e glicosaminoglicanos também para o SINV e um receptor semelhante à laminina em células de mosquitos para o VEEV (SOLIGNAT et al., 2009; STRAUSS; STRAUSS, 1994).

Após a ligação com a célula hospedeira, que é feita pela glicoproteína *E2*, o vírus é internalizado através de endocitose mediada pelo receptor (LEUNG; NG; CHU, 2011; MUKHOPADHYAY et al., 2006; WEAVER et al., 2012). O baixo pH do endossomo desencadeia alterações conformacionais nas glicoproteínas de envelope. *E1* se dissocia do

heterodímero *E1-E2* e expõe um peptídeo hidrofóbico que é responsável pela fusão das membranas viral e do endossomo (GAROFF; SJÖBERG; CHENG, 2004; RYMAN; KLIMSTRA, 2008; WEAVER et al., 2012). Logo após a fusão das membranas, o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma e ocorre a sua dissociação. O RNA é então traduzido na poliproteína não-estrutural (LEUNG; NG; CHU, 2011; RUPP et al., 2015).

O processamento inicial produz a poliproteína P123 e a proteína nsP4. Essas duas proteínas formam um complexo de replicação (também denominado esférula) instável, responsável pela síntese de RNA senso negativo. Com uma clivagem adicional é formado o complexo estável nsP1-P23-nsP4, responsável pela síntese dos RNAs genômico e subgenômico senso-positivo, sendo este último usado para a produção das proteínas estruturais (GAROFF; SJÖBERG; CHENG, 2004; LEUNG; NG; CHU, 2011; RUPP et al., 2015; SPUUL et al., 2011). Em seguida, ocorre a tradução da poliproteína estrutural, a sua clivagem, a formação do nucleocapsídeo e por fim o brotamento de uma partícula viral madura (GAROFF; SJÖBERG; CHENG, 2004; LEUNG; NG; CHU, 2011; RYMAN; KLIMSTRA, 2008).

### 2.2.1 *Chikungunya virus*

*Chikungunya virus* (CHIKV) é um arbovírus de RNA fita simples, polaridade positiva, pertencente ao gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae* (SILVA; DERMODY, 2017). Provoca uma doença que se caracteriza por febre alta de início repentino, mialgia, cefaleia, erupção cutânea, náuseas, vômitos e artralgia, sendo este, o sintoma mais característico e que geralmente, é grave e atinge várias articulações do corpo em um padrão simétrico podendo ainda, persistir por vários anos (ARANKALLE et al., 2007; SILVA; DERMODY, 2017; SUBHUDI et al., 2018; WEAVER et al., 2018; WEAVER; REISEN, 2010; WONG; CHU, 2018).

A transmissão do CHIKV ocorre através da picada de mosquitos do gênero *Aedes* e apresenta dois ciclos (PARDIGON, 2009). O primeiro ciclo é enzoótico e ocorre entre primatas não-humanos e algumas espécies de mosquitos selvagens do gênero *Aedes* como o *Aedes furcifer*, *Aedes luteocephalus*, *Aedes taylori*, *Aedes africanus* e *Aedes neoaficanus* na África (COFFEY; FAILLOUX; WEAVER, 2014; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2015; POWERS; LOGUE, 2007; SINGH; UNNI, 2011). O segundo ciclo é urbano e a transmissão ocorre entre mosquitos e seres humanos. Neste ciclo, os principais vetores envolvidos são os mosquitos antropofílicos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, que são amplamente distribuídos em regiões tropicais e sub-tropicais e também em regiões mais temperadas, no caso do *Aedes albopictus* (COFFEY; FAILLOUX; WEAVER, 2014; PARDIGON, 2009; THIBERVILLE et al., 2013b).

### 2.1.1.1 Epidemiologia

O CHIKV foi identificado pela primeira vez em 1952 na província de Tanganyika, Tanzânia, durante um surto de uma doença febril desconhecida que se caracterizava por intensa artralgia (BURT et al., 2017; ROBINSON, 1955; ROSS, 1956). O nome deriva de uma palavra da língua Makonde, idioma falado nessa região, e que significa “aquele que se enverga” ou “tornar-se contorcido” em referência à postura encurvada das pessoas acometidas pela enfermidade (BURT et al., 2012; FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014; LUMSDEN, 1955; ROBINSON, 1955; SUBHUDI et al., 2018).

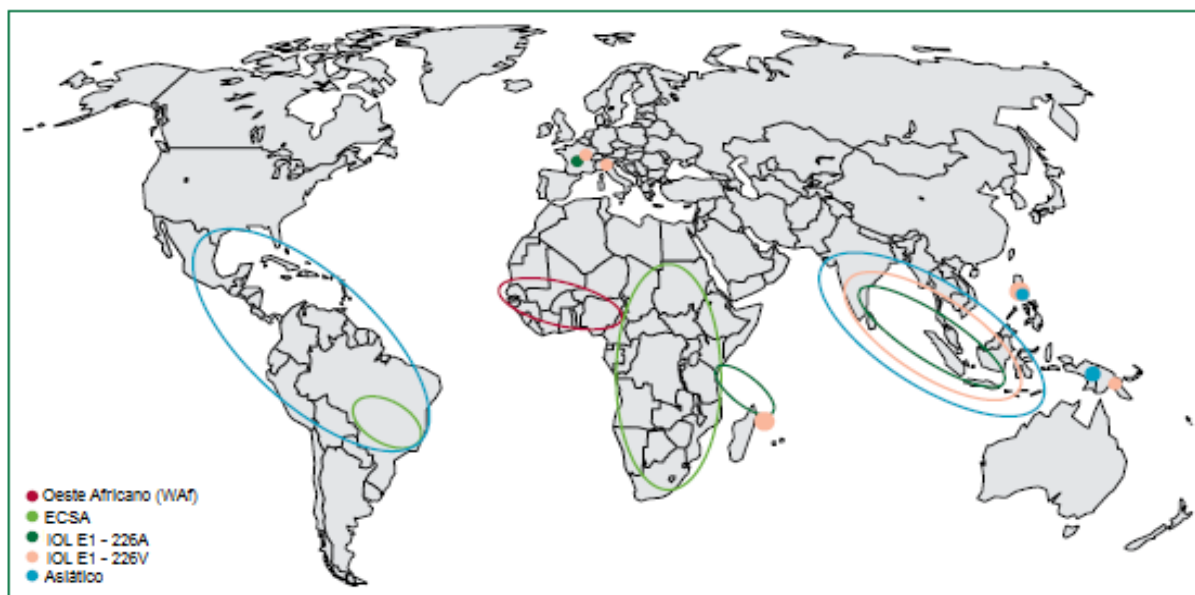
Após a sua primeira descrição, vários relatos de casos esporádicos ou surtos do CHIKV foram feitos em vários países africanos e asiáticos (BURT et al., 2017; SINGH; UNNI, 2011; ZELLER; BORTEL; SUDRE, 2016). Os primeiros surtos urbanos de CHIKV ocorreram no continente asiático, na Tailândia, na década de 1960 (STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009). Depois, entre 1963 e 1973 foram registrados surtos em cidades indianas como Calcutá, Madras, Vellore, Barsi, entre outras (ARANKALLE et al., 2007; STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009). A partir desse momento, a atividade do CHIKV foi registrada de forma intermitente em países da África e da Ásia até o começo dos anos 2000, com muitos desses relatos ocorrendo após um grande intervalo de tempo entre um surto e outro (ARANKALLE et al., 2007; BURT et al., 2017; LARAS et al., 2005; POWERS; LOGUE, 2007; ZELLER; BORTEL; SUDRE, 2016).

Porém, no ano de 2004 uma grande epidemia de CHIKV emergiu na ilha Lamu, região costeira do Quênia, e atingiu um número estimado de 13.500 pessoas, 75% da população da ilha (SERGON et al., 2008). A partir dessa epidemia, o vírus se disseminou para outros países africanos, para países do Oceano Índico, Índia e Sudeste Asiático (JOSSERAN et al., 2006; POWERS; LOGUE, 2007; SCHWARTZ; ALBERT, 2010; SISSOKO et al., 2008; SERGON et al., 2007; STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009). Em seguida, o CHIKV atingiu a Europa e por último, chegou ao continente americano (LEPARC-GOFFART et al., 2014; PETERSEN; POWERS, 2016; REZZA et al., 2007; SCHWARTZ; ALBERT, 2010).

Na América, o primeiro caso autóctone foi relatado na ilha caribenha de Saint Martin, em outubro de 2013 (LEPARC-GOFFART et al., 2014), embora casos importados já tenham sido descritos nos Estados Unidos (LANCIOTTI et al., 2007) e no Brasil (ALBUQUERQUE et al., 2012). Nessa ocasião, os vírus isolados pertenciam ao genótipo asiático e não ao genótipo Leste-Centro-Sul Africano (ECSA) que foi o responsável pelas epidemias no Oceano Índico e por casos em alguns países europeus (LEPARC-GOFFART et al., 2014; WEAVER, 2014). A partir de então, o vírus se tornou uma preocupação para as autoridades de Saúde Pública, principalmente, pelo seu alto potencial para se disseminar por várias regiões americanas, inicialmente, na região do Caribe, onde o grande fluxo de turistas provenientes em sua maior parte, da Europa e da América continental e também a presença de mosquitos vetores do

gênero *Aedes*, eram apontados como os principais fatores envolvidos nessa possível disseminação do vírus (CAUCHEMEZ et al., 2014).

No Brasil, o primeiro caso de infecção autóctone por CHIKV foi identificado em setembro de 2014, na cidade de Oiapoque, Estado do Amapá (LIMA-CÂMARA, 2016; NUNES et al., 2015). Como visto em outros lugares da América, o genótipo do vírus era o Asiático, até então, o único registrado no continente (NUNES et al., 2015). Uma semana depois, três pacientes que não tinham histórico de viagem foram identificados com infecção pelo CHIKV genótipo ECSA na cidade de Feira de Santana, Estado da Bahia. Este foi o primeiro relato da circulação deste genótipo na América (NUNES et al., 2015). Segundo os autores, o CHIKV genótipo ECSA foi introduzido na Bahia a partir de uma pessoa vinda de Angola em Junho de 2014. Desde então, o CHIKV vem preocupando as autoridades de saúde devido aos surtos ocorridos em vários estados do Brasil, principalmente no Nordeste (BRASIL, 2018; COLUCCI, 2016; MOTA et al., 2016). Mais informações sobre a distribuição do CHIKV são mostradas na Figura 3.



**Figura 3.** Distribuição mundial de *Chikungunya virus*. Dispersão espacial dos genótipos de CHIKV com base nos diferentes surtos e epidemias. Adaptado de Burt et al., 2017.

Dados do Ministério da Saúde brasileiro mostram que entre os anos de 2015 e 2017, ocorreu um considerável aumento no número de casos de CHIKV no país, passando de 38.332 casos prováveis em 2015 para 277.882 em 2016 (BRASIL, 2016; BRASIL, 2017). Em 2017, foi observado uma redução nos casos (185.854), contudo, ainda é um número representativo quando comparado com a situação epidemiológica do ano de 2015. Vale notar que, a maior parte dos casos nos três anos (~94% em 2015; ~87% em 2016 e 76,5% em 2017) foram registrados na região Nordeste (BRASIL, 2016; BRASIL, 2017).



O Estado do Piauí seguiu a tendência da região Nordeste. Em 2015, apenas 321 casos foram notificados. No ano seguinte, 2.774 casos foram relatados, um aumento de 864,17%. Em 2017, houve uma redução nacional no número de casos notificados de CHIKV e a região Nordeste apresentou o mesmo padrão, no entanto, o Piauí e o Ceará foram os únicos estados onde foi observado um aumento no número de casos, com o Piauí registrando 6.319 casos (BRASIL, 2016; BRASIL, 2017; BRASIL, 2018). Testes moleculares realizados no laboratório de Bioquímica e Biologia de Micro-organismos e Plantas (BIOMIC) da Universidade Federal do Piauí nos anos de 2016 e 2017 foram capazes de identificar a circulação de CHIKV no Estado (BARROS, 2018; CARDOSO, 2017). Esses dados destacam a importância da realização de mais pesquisas na investigação da distribuição desse patógeno e do perfil epidemiológico da infecção na região Nordeste e também no Estado do Piauí.

### 2.2.1.2 Diversidade Genética

O CHIKV possui apenas um sorotipo. No entanto, três genótipos foram descritos: o Oeste Africano (Waf); Leste-Centro-Sul Africano (ECSA) e o genótipo Asiático (MOTA et al., 2016). Posteriormente, uma linhagem derivada do genótipo ECSA, a linhagem do Oceano Índico (IOL), foi descrita. Essa linhagem resultou de uma única alteração de aminoácidos na glicoproteína *E1* (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014; SCHUFFENECKER et al., 2006; TSETSARKIN et al., 2007). Estes genótipos foram estabelecidos com base na distribuição geográfica dos isolados e também nas sequências dos genes *E1*, *E2*, *nsP1* e em sequências genômicas completas (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014; GANESAN; DUAN; REID, 2017; MOTA et al., 2016; POWERS et al., 2000; SCHUFFENECKER et al., 2006; THIBERVILLE et al., 2013b).

Os genótipos Waf e ECSA se originaram na África, e provavelmente evoluíram de um mesmo ancestral, tendo divergido na escala evolutiva há aproximadamente 350 anos (WEAVER; REISEN, 2010). Este fato contribuiu para a formulação da hipótese de que o vírus tenha surgido no continente africano (BURT et al., 2012; WEAVER; REISEN, 2010). A propagação do vírus africano foi possível graças à um ciclo enzoótico envolvendo mosquitos *Aedes* selvagens e primatas não-humanos (SINGH; UNNI, 2011; VOLK et al., 2010). O genótipo Asiático provavelmente se originou de um genótipo africano que tenha ficado isolado por um bom período de tempo no continente (BURT et al., 2012; THIBERVILLE et al., 2013b).

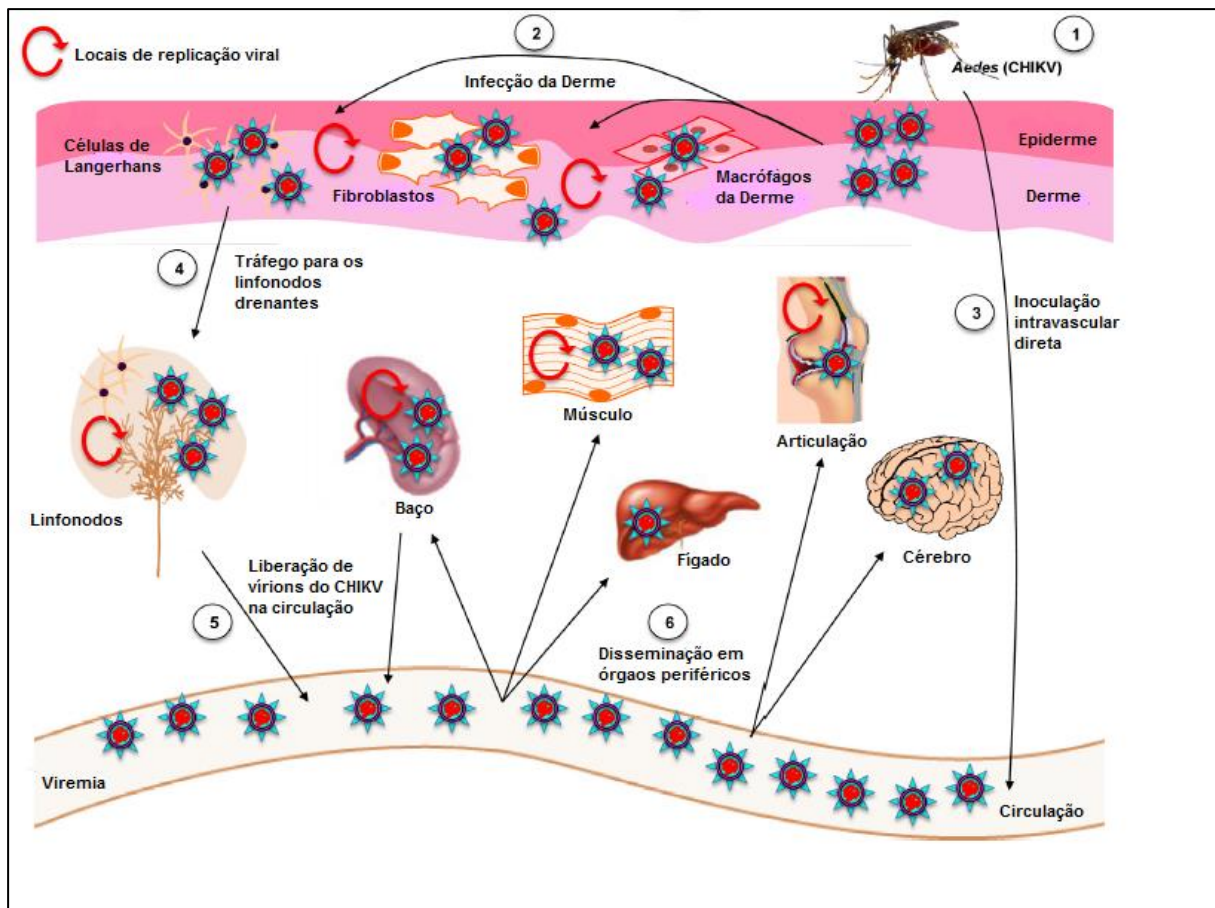
A Linhagem do Oceano Índico (IOL), derivada do genótipo ECSA, foi a responsável pelas epidemias na África, Índia, nas ilhas do Oceano Índico e Europa a partir de 2004 (COFFEY et al., 2013; SCHWARTZ; ALBERT, 2010; VOLK et al., 2010). Essa ampla disseminação resultou de uma mutação pontual do gene *E1*, em que houve a troca de um aminoácido Alanina por uma Valina na posição 226 tornando assim, o vírus apto em infectar o mosquito *Aedes albopictus*. Desde então, o vírus se propagou por diferentes regiões

provocando surtos e epidemias (BURT et al., 2012; BURT et al., 2017; CAGLIOTI et al., 2013; SCHWARTZ; ALBERT, 2010; SINGH; UNNI, 2011; STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009; THIBERVILLE et al., 2013a; THIBERVILLE et al., 2013b).

### **2.2.1.3 Patogênese e Aspectos Clínicos**

O CHIKV é inoculado na derme através da picada das fêmeas dos mosquitos do gênero *Aedes* durante o repasto sanguíneo. Logo após, o vírus começa a se replicar no local da inoculação. Várias células residentes estão presentes, como fibroblastos, macrófagos da derme, células de Langerhans e células dendríticas (KAM et al., 2009; LUM; NG, 2015). O vírus também pode ser inoculado direto nos vasos sanguíneos e assim, se disseminar para os órgãos-alvo (LUM; NG, 2015). Quando é inoculado intradermicamente, o CHIKV, após sua replicação inicial, atinge o tecido subcutâneo onde sofre fagocitose. Entre as responsáveis pela fagocitose, estão as células dendríticas que em seguida, migram aos linfonodos e apresentam os antígenos do CHIKV ao sistema imunológico (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014).

Nos linfonodos, o vírus infecta e se multiplica em outras células, como monócitos, macrófagos e outros leucócitos, onde é produzida uma resposta baseada em interferon (IFN) e outras citocinas, na tentativa de limitar a infecção (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014; KAM et al., 2009; LUM; NG, 2015). Essas células infectadas saem dos linfonodos e, através da corrente sanguínea, atingem locais alvo, como o fígado, músculos, articulações e o cérebro, onde os vírus se reproduzem, ocasionando as manifestações clínicas da doença, (Figura 4), (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014; LO PRESTI et al., 2014; LUM; NG, 2015; SCHWARTZ; ALBERT, 2010).



**Figura 4.** Representação esquemática da entrada e disseminação do CHIKV no organismo humano. 1) Fêmea dos mosquitos *Aedes* sp. infectadas com o CHIKV inoculam o vírus ao picar o ser humano; 2) CHIKV infecta e se replica nas células residentes da derme; O vírus também pode ser inoculado diretamente na corrente sanguínea, 3); 4) As células da derme infectadas migram para os linfonodos drenantes e em seguida, ocorre a liberação dos virions na corrente sanguínea, 5); 6) Da circulação, o vírus pode se disseminar para vários órgãos, como fígado, baço, cérebro, além das articulações e músculos. Fonte: Adaptado de Lum; Ng, 2015.

O período de incubação do vírus no organismo é muito variável, mas geralmente fica entre 2 - 12 dias (BURT et al., 2012; SINGH; UNNI, 2011; STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009; THIBERVILLE et al., 2013b). A produção de anticorpos de fase aguda da classe de Imunoglobulinas M - IgM - ocorre durante a viremia, geralmente entre o terceiro e o oitavo dia, que coincide com o início dos sintomas (COUDERC; LECUIT, 2015; SCHWARTZ; ALBERT, 2010; WEAVER; LECUIT, 2015). A produção dos anticorpos de fase crônica, da classe de Imunoglobulinas G, IgG, se sobrepõe à produção dos anticorpos IgM, geralmente ocorrendo entre o quarto e o décimo dia (COUDERC; LECUIT, 2015; SUHRBIER; JAFFAR-BANDJEE, GASQUE, 2012).

A evolução clínica da doença subdivide-se em 3 fases: Aguda, sub-aguda e crônica (AN et al., 2017; MARQUES et al., 2017). A fase aguda tem um início abrupto e os principais sintomas primários incluem febre alta que pode durar de alguns dias até 2 semanas (STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009), acompanhada ou não por artralgia, mialgia, cefaleia, dor retro-orbitária, calafrios, exantema com ou sem prurido, que pode ocorrer no tronco, na face, nas palmas das mãos ou nas solas dos pés, e fadiga (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO,

2014; GOULD et al., 2017). A poliartralgia é a principal manifestação clínica desta enfermidade, desenvolvendo-se em padrão simétrico, atingindo as articulações do tornozelo, punhos e pequenas articulações da mão, e também grandes articulações do corpo humano como os joelhos, e ombros (MOTA et al., 2016; STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009; THIBERVILLE et al., 2013b).

A fase sub-aguda é uma fase intermediária da evolução clínica da Febre Chikungunya, que se estende do final da fase aguda, por volta do décimo quarto dia, até os três meses. Ela pode ocorrer em até 50% dos indivíduos acometidos pelo vírus (MARQUES et al., 2017). É caracterizada por sintomas articulares, como a artralgia, artrite, bursite, tenossinovite, rigidez matinal e astenia, que podem ter evolução contínua ou intermitente (DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012; MARQUES et al., 2017). Além desses sintomas, inflamação sinovial e periarticular, distúrbios vasculares periféricos, neuropatias e distúrbios neuropsiquiátricos podem ser vistos nessa fase da doença (AN et al., 2017).

A fase crônica da doença é caracterizada por intensa e debilitante artralgia, podendo ou não, ser acompanhada por edema (inchaço) (STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009). Os pacientes podem sofrer ainda, de episódios recidivantes de artrite crônica debilitante por anos após a infecção inicial (MOTA et al., 2016; STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009). Acredita-se que isto deva ocorrer pela persistência do vírus nos tecidos das articulações ou pela forte resposta imune do hospedeiro nos locais afetados (ASSUNÇÃO-MIRANDA; CRUZ-OLIVEIRA, POIAN, 2013; DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012; MOTA et al., 2016), sendo esse quadro mais comumente encontrado em indivíduos com outras comorbidades, em idosos e imunocomprometidos (SUHRBIER; JAFFAR-BANDJEE, GASQUE, 2012).

Outras manifestações menos comuns que podem ocorrer durante o curso da infecção por CHIKV, incluem: encefalites, paralisia flácida, meningite, Síndrome de Guillain-Barré, uveíte, neuroretinite, miocardite, pneumonia, insuficiência hepática, dermatite bolhosa, insuficiência respiratória, manifestações hemorrágicas e lesões necrosantes da pele (BORGHERINI et al., 2007 ECONOMOPOULOU et al., 2009; FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014; MOTA et al., 2016; NKOGHE et al., 2012; STAIKOWSKY et al., 2009; STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009; TORRES et al., 2015).

Os grupos mais suscetíveis ao desenvolvimento de manifestações clínicas graves são os recém-nascidos, idosos e imunocomprometidos (STAPLES; FISCHER, 2014). Os neonatos podem ser infectados verticalmente, isto é, através da transmissão materno-fetal nos períodos anteparto, intraparto e pré-parto (RAJAPAKSE; RODRIGO; RAJAPAKSE, 2010; BANDEIRA et al., 2016; BURT et al., 2017). A transmissão materno-fetal ocorreu mais frequentemente nas mães que apresentaram viremia durante o período intraparto e os seus filhos recém-nascidos, tiveram frequentemente, uma infecção neonatal mais grave (GÉRARDIN et al., 2008a).

Na população idosa, a idade mais avançada é um fator que predispõe a persistência da artralgia na fase crônica, infecções com maior gravidade e até mesmo raros casos de óbito. Além disso, alguns outros fatores podem influenciar a resposta do organismo, como a presença de comorbidades como o diabetes, hipertensão e outras doenças cardiovasculares que suscetibilizam o sistema imunológico dos indivíduos, diminuindo assim, a resposta contra a infecção por CHIKV (BURT et al., 2012; BURT et al., 2017; FOX; DIAMOND, 2016; SISSOKO et al., 2008; STAPLES; FISCHER, 2014).

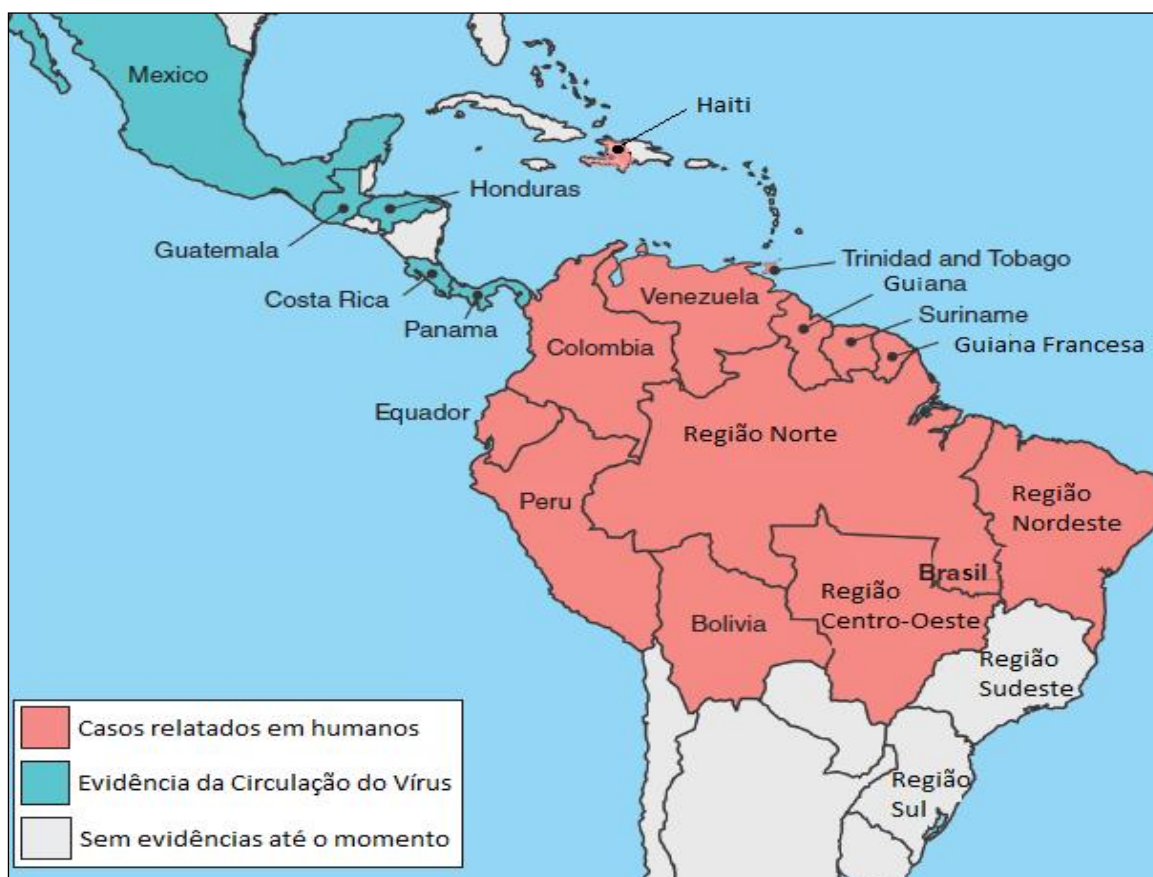
Em relação aos indivíduos imunocomprometidos, a infecção pelo CHIKV pode ser associada a desfechos clínicos diferentes. Em Singapura, dois casos de infecção pelo CHIKV em pacientes com alguma comorbidade foram relatados. O primeiro caso foi um homem idoso de 66 anos com um histórico de doença renal crônica que desenvolveu peritonite e pneumonia associada à ventilação mecânica. O RNA do CHIKV foi detectado no fluido peritoneal concomitantemente com bactérias e fungos, e por causa disso, o CHIKV não foi identificado como a causa da peritonite. Ele evoluiu para o óbito cinco meses após a hospitalização (KEE; YANG; TAMBYAH, et al., 2010).

O outro caso foi de um homem de 45 anos com histórico de diabetes *mellitus* e transplante de fígado e que estava sob uso de imunossupressores. Na fase aguda, o paciente apresentou sintomas comuns, como febre, cefaleia, artrite e inchaço abdominal. Entretanto, a cefaleia persistiu, juntamente com sonolência transitória e os resultados de ressonância magnética sugeriram o desenvolvimento de encefalite. Apesar disso, o paciente evoluiu clinicamente bem (KEE; YANG; TAMBYAH, et al., 2010). Assim, pode-se observar que indivíduos imunocomprometidos podem responder de maneira diferente à infecção pelo CHIKV e que co-infecções podem ser um fator de agravo da condição clínica.

## **2.2.2 Mayaro virus**

### **2.2.2.1 Epidemiologia**

MAYV é um arbovírus pertencente ao gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae* (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018; ZUCKERMAN et al., 2004). Recebeu esse nome porque foi isolado primeiramente no Condado Mayaro, em Trinidad e Tobago, no ano de 1954, a partir do sangue de quatro trabalhadores rurais e de uma mulher que morava na zona urbana que se apresentaram com uma doença febril (ESPOSITO; FONSECA, 2017; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; MOURÃO et al., 2012; ZUCHI et al., 2014). Desde então, o vírus se espalhou por vários países da América Latina, em especial, nas Américas Central e do Sul, causando surtos de doença febril acompanhada por artralgia, conforme visto na Figura 5 (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018; LEDNICKY et al., 2016; MOTA et al., 2015; TALARMIN et al., 1998; TERZIAN et al., 2015; VASCONCELOS; CALISHER, 2016).



**Figura 5.** Distribuição espacial do MAYV na América Latina. Fonte: Adaptado de Mota et al., 2015.

No Brasil, o primeiro relato de infecção por este vírus ocorreu em 1955, no estado do Pará, próximo ao rio Guamá (ESPOSITO; FONSECA, 2017). Posteriormente, em 1957 ocorreu o primeiro surto do país nessa mesma região. Aproximadamente 100 pessoas foram atingidas e o MAYV foi isolado de 6 pacientes (MOURÃO et al., 2012). Contudo, a primeira epidemia do país ocorreu em 1978, em Belterra, no Pará, com um total de 55 pacientes confirmados (43 por isolamento viral e 12 por testes sorológicos) (ESPOSITO; FONSECA, 2017; PINHEIRO et al., 1981 *Apud* TERZIAN et al., 2015).

Outros casos também foram registrados nas duas décadas seguintes na região Norte do país. Em 1981, um surto ocorreu em Conceição do Araguaia, Pará. Dez anos depois, casos foram relatados na cidade de Benevides, também no Pará e em Peixe, no Estado do Tocantins (ESPOSITO; FONSECA, 2017). Atualmente, sabe-se que o MAYV circula de forma endêmica nas regiões Norte (Amazonas, Acre e Pará), e Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), principalmente, nas áreas da Floresta Amazônica (ABAD-FRANCH et al., 2012; BRUNINI et al., 2017; COIMBRA et al., 2007; MOURÃO et al., 2012; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2015; TERZIAN et al., 2015; ZUCHI et al., 2014).

Adicionalmente, dados recentes divulgados pelo Ministério da Saúde brasileiro mostraram que no período compreendido entre Dezembro de 2014 e Janeiro de 2016, houve

343 notificações de doença ocasionada pelo MAYV. Os casos foram registrados em três regiões, Norte, Centro-Oeste e Nordeste, com destaque para o Centro-Oeste e principalmente, para o Estado de Goiás que concentrou 53,3% dos casos notificados (n=183), seguido por Pará (68 – 19,8%) e Tocantins (25 – 7,2%). Do total de notificações, apenas 70 foram confirmadas, com a maioria, sendo também do Estado de Goiás (60) acompanhada do Tocantins (9) e Pará (1). É interessante notar, que dentre essas notificações, um caso suspeito de infecção por MAYV foi registrado no Estado da Bahia, sugerindo assim, uma circulação silenciosa do vírus na região Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

#### **2.2.2.2 Diversidade Genética**

Com base em análises filogenéticas e na distribuição geográfica dos isolados, o MAYV pode ser classificado em três genótipos: o genótipo D (Disperso), L (Limitado) e N (Novo) (AUGUSTE et al., 2015; MAVIAN et al., 2017; POWERS et al., 2006). O genótipo D corresponde à isolados de 1954 a 2003 dispersos por países da América Central e do Sul: Trinidad e Tobago, Brasil, Guiana Francesa, Suriname, Peru e Bolívia (MACKAY; ARDEN, 2016; POWERS et al., 2006; TERZIAN et al., 2015). O genótipo L agrupa apenas 6 isolados do período de 1955-1991, limitados à região Norte do Brasil (POWERS et al., 2006; TERZIAN et al., 2015). O genótipo N foi identificado recentemente, em 2010. Ele contém apenas uma estirpe, isolada no Peru (AUGUSTE et al., 2015; TERZIAN et al., 2015; MACKAY; ARDEN, 2016; ESPOSITO; FONSECA, 2017).

#### **2.2.2.3 Modos de Transmissão**

O MAYV é mantido na natureza em um ciclo enzoótico semelhante ao da Febre Amarela selvagem (ESPOSITO; FONSECA, 2017; FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014; MOTA et al., 2015). Ele é transmitido pela picada de mosquitos do gênero *Haemagogus*, especialmente, o *Haemagogus janthinomys*, o mesmo vetor envolvido no ciclo silvestre do vírus da Febre Amarela (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018; ESPOSITO; FONSECA, 2017).

A ecologia do MAYV não é totalmente conhecida, mas sabe-se que além do gênero *Haemagogus*, vetores secundários de outros gêneros como *Psorophora*, *Culex*, *Mansonia*, *Sabethes* e *Aedes* foram identificados com o MAYV, sugerindo que eles também possam estar envolvidos na transmissão (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018; SERRA et al., 2016). Ademais, vários hospedeiros vertebrados incluindo primatas não-humanos, roedores, pássaros, preguiças e pequenos mamíferos foram identificados como possíveis reservatórios virais (ESPOSITO; FONSECA, 2017; MOTA et al., 2015).

As infecções humanas são acidentais e ocorrem mais frequentemente em indivíduos que moram próximos à áreas de florestas tropicais ou zonas rurais ou em pessoas que trabalham nesse ambiente (ABAD-FRANCH et al., 2012; FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014;

TERZIAN et al., 2015; ZUCHI et al., 2014). Além destes indivíduos, turistas também podem se tornar infectados ao visitar países onde o MAYV é endêmico (LLAGONNE-BARETS et al., 2016; RECEVEUR et al., 2010). Infecções laboratoriais são ainda mais raras. Até hoje, um único caso foi descrito (JUNT et al., 1999), sugerindo que o MAYV possa ser transmitido via aerossol, embora essa via de transmissão não seja tão importante epidemiologicamente (MOTA et al., 2015).

#### **2.2.2.4 Patogênese e Aspectos Clínicos**

Apesar de descoberto há mais de 60 anos, pouco ainda se sabe sobre a fisiopatologia da Febre do Mayaro (ESPOSITO; FONSECA, 2017). Atualmente, sabe-se que a Febre do Mayaro é uma doença que apresenta duas fases, uma aguda e a subaguda, também chamada de convalescente (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018; MOTA et al., 2015). Após ser inoculado, o vírus passa por um período de incubação no organismo que varia de 7 a 12 dias (MOTA et al., 2015; MOTA et al., 2016).

Logo em seguida, inicia-se a fase aguda da doença que coincide com o período de viremia, que é transitória e dura geralmente, entre 3 e 5 dias (MOURÃO et al., 2012; ZUCHI et al., 2014). Na fase aguda, os principais sintomas são febre, cefaleia, mialgia, calafrios, fotofobia, rash, dor epigástrica, vertigem, e a artralgia que é o sintoma mais debilitante e característico dessa doença (MOTA et al., 2016; ZUCHI et al., 2014). Manifestações hemorrágicas também podem ser vistas nessa fase da doença (MOURÃO et al., 2012).

Depois da fase aguda, que dura cerca de 5 dias, tem-se início a fase convalescente ou subaguda (MOTA et al., 2015; MOURÃO et al., 2012). Nessa fase, a artralgia e a artrite são os sintomas mais característicos (MOTA et al., 2015). A artralgia pode ser dolorosa e altamente incapacitante e pode acometer várias articulações dos membros superiores (ombro, cotovelo, punho e mão) e inferiores (quadril, joelho, tornozelo e pé) (HALSEY et al., 2013; MOTA et al., 2015). A artrite é menos comum do que a artralgia, mas ela pode aparecer e persistir por meses após a doença (MOTA et al., 2015).

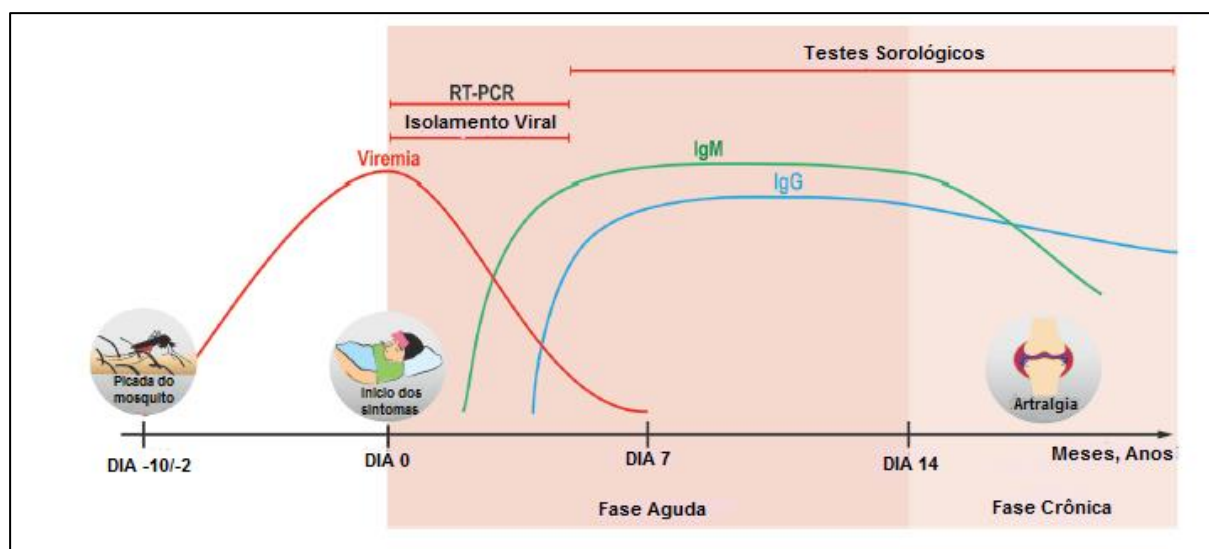
### **2.3 Diagnóstico Laboratorial do CHIKV e do MAYV**

Arboviroses são doenças difíceis de serem classificadas em relação ao agente etiológico levando-se em conta somente o exame clínico e a anamnese uma vez que, há uma sobreposição dos sintomas entre algumas delas, principalmente, na fase aguda (BRONZONI et al., 2005; WAGGONER et al., 2016). Por esse motivo, a utilização de testes laboratoriais confiáveis é fundamental para a correta detecção e diferenciação entre os arbovírus, incluindo o CHIKV e o MAYV, além de permitir o correto manejo de pacientes e o desenvolvimento de estratégias de vigilância que investiguem surtos, evitem e contenham epidemias (BRONZONI



et al., 2004; BRONZONI et al., 2005; FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014; MARDEKIAN; ROBERTS, 2015; WAGGONER et al., 2016).

Os métodos de diagnóstico de infecções virais podem ser classificados em dois tipos: Os métodos virológicos (diretos) e sorológicos (indiretos), sendo empregados de acordo com a cinética da viremia e com a resposta de anticorpos (BURT et al., 2012; RABENAU et al., 2007). São ditos virológicos, o isolamento viral em cultura de células, microscopia eletrônica de transmissão, detecção molecular através de RT-PCR e o Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima - ELISA para a detecção de antígenos (KASHYAP et al., 2010; MARDEKIAN; ROBERTS, 2015; MOHAN et al., 2010; OKABAYASHI et al., 2015; PEELING et al., 2010; RABENAU et al., 2007). Um esquema diagnóstico da infecção pelo CHIKV que pode servir como modelo para outros alfavírus, como o MAYV, mostrando os principais testes utilizados de acordo com o período da infecção está apresentado na figura 6.



**Figura 6.** Representação esquemática do fluxo diagnóstico da infecção pelo CHIKV mostrando os diferentes métodos empregados de acordo com o período da infecção. (Adaptado de Tanabe et al., 2018).

O isolamento viral é uma técnica específica, que visa a obtenção da partícula viral inteira a partir de amostras de sangue total, plasma, soro, ou de tecidos de casos fatais em células cultivadas. Contudo, este método não é empregado na rotina laboratorial devido ao seu alto custo, demanda de tempo e de profissionais qualificados (LORENZ et al., 2017; MARDEKIAN; ROBERTS, 2015).

Os métodos sorológicos são utilizados em um período mais tardio, nas fases subaguda e crônica, e são normalmente empregados como testes de triagem, devido ao seu baixo custo e facilidade de acesso (PEELING et al., 2010). O principal exemplo é o ELISA para a detecção de imunoglobulinas da classe M (IgM) e de imunoglobulinas da classe G (IgG), além de testes rápidos imunocromatográficos, inibição da hemaglutinação e testes de neutralização

(JOHNSON et al., 2016; MARDEKIAN; ROBERTS, 2015; MOHAN et al., 2010). No entanto, apresentam algumas desvantagens, como: a) resultados falso-negativos quando realizado no período de viremia, o que pode resultar em subnotificação dos casos de uma doença; b) reatividade cruzada entre espécies muito próximas de um gênero e c) não diferenciação entre sorotipos (BRONZONI et al., 2005; ESPOSITO; FONSECA, 2017; MARDEKIAN; ROBERTS, 2015; MOURÃO et al., 2015; KASHYAP et al., 2010).

Adicionalmente, testes sorológicos têm sido empregados nos últimos anos, para a detecção de antígenos do CHIKV (KASHYAP et al., 2010; OKABAYASHI et al., 2015). O desenvolvimento e a utilização destes testes vêm se mostrando como uma solução viável para problemas inerentes aos testes empregados para a detecção de anticorpos: resultados falso-negativos em amostras coletadas na fase aguda da infecção e a reatividade cruzada entre alfavírus relacionados (KASHYAP et al., 2010). Além desses problemas, a aplicação de testes rápidos imunocromatográficos desenvolvidos para a detecção de antígenos pode ser útil em locais em que há a co-circulação do CHIKV e do DENV, mas que não possuem uma estrutura para a realização de exames laboratoriais capazes de distinguir entre essas duas infecções (OKABAYASHI et al., 2015).

Uma alternativa aos testes de detecção de antígenos e que é mais confiável, sensível e específica é a utilização de métodos moleculares para a detecção de regiões distintas do genoma viral durante a fase aguda das infecções (BRONZONI et al., 2005; MARDEKIAN; ROBERTS, 2015). Entre eles, destaca-se a RT-PCR, que pode ser tanto convencional como quantitativa em tempo real (BARROS, 2018; BURT et al., 2012; EDWARDS et al., 2007; KUMAR et al., 2007; PFEFFER et al., 2002; TALARMIN et al., 1998). Além de permitir a identificação, os testes moleculares possibilitam o monitoramento da circulação de vírus numa determinada área, fornece novas informações sobre a natureza dos ciclos de transmissão viral e sobre os padrões epidemiológicos e permite a investigação de novos patógenos potenciais (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018; SAM et al., 2015).

Assim, com base nas informações acima expostas, é possível perceber que não existe um método diagnóstico ideal para a detecção do CHIKV e do MAYV, bem como dos arbovírus em geral. O período da coleta de amostras é um fator essencial para se avaliar a eficiência de um determinado método e conseqüentemente, fornecer um diagnóstico mais confiável (TANABE et al., 2018).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Quantificar a positividade do CHIKV em amostras de pacientes com suspeita clínica da infecção empregando técnicas moleculares e sorológicas, bem como investigar uma possível circulação de MAYV no Estado do Piauí utilizando técnicas moleculares.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Identificar CHIKV em amostras de soro de pacientes com sinais e sintomas compatíveis com a infecção empregando a técnica de RT-PCR e testes sorológicos;
- Descrever o perfil clínico-epidemiológico dos pacientes positivos para CHIKV;
- Padronizar protocolos de RT-PCR para a detecção do MAYV;
- Investigar uma possível circulação silenciosa do MAYV no Estado do Piauí em amostras com sintomatologia sugestiva da infecção, por RT-PCR.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Aspectos Éticos e Legais

A pesquisa foi executada mediante apreciação e aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí, com parecer de nº 1197662 (CAAE: 46111615.0.0000.5214), conforme a Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos.

### 4.2 Coleta de Amostras e Caracterização do Perfil Clínico-Epidemiológico

Pacientes que apresentaram sinais e sintomas clássicos de infecção por arbovírus e que procuraram atendimento no Pronto Socorro Municipal (PSM) e no Hospital Estadual Dirceu Arcoverde (HEDA) da cidade de Parnaíba, Piauí, foram buscados e entrevistados quanto a possibilidade de participação na pesquisa. Havendo o aceite, os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (ANEXO I). Prosseguiu-se com a coleta das amostras que foi realizada pelos funcionários dos serviços de saúde. Em seguida, as amostras coletadas foram transportadas ao Laboratório BIOMIC da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, onde foram armazenadas adequadamente em freezer - 70°C até a realização da análise.

A caracterização do perfil clínico-epidemiológico dos pacientes foi realizada através da aplicação de um formulário semi-estruturado (ANEXO II) e também através de testes sorológicos, testes rápidos imunocromatográficos e/ou ELISA, para a detecção de anticorpos IgM e/ou IgG anti-CHIKV realizados no Laboratório Central Dr. Costa Alvarenga (LACEN-PI). Os resultados dos testes foram obtidos através de consulta ao banco de dados do Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL).

### 4.3 Extração de RNA Viral seguida por Transcrição Reversa (RT)

Para a extração do RNA viral das amostras, foi utilizado o kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Alemanha), seguindo as orientações do fabricante. Depois de ser obtido, o RNA foi convertido em DNA complementar (cDNA) através do processo de transcrição reversa (RT) utilizando a enzima Transcriptase Reversa obtida do vírus MMLV (do inglês *Moloney Murine Leukemia virus*). Em seguida, foram utilizados iniciadores aleatórios, *Random Hexamers*, que são oligodesoxirribonucleotídeos de sequências curtas e randômicas [d(N)<sub>6</sub>] capazes de se anelarem em sítios aleatórios do RNA permitindo assim, a síntese de cDNA. A reação de transcrição reversa foi dividida em duas etapas.

Na primeira etapa, 10µL de RNA molde foram incubados com 5µL do iniciador *Random Hexamers* no termociclador *Thermal Cyclers (Amplitherm®)* a 25°C por 10 min e 70°C por 5

minutos. Depois de serem retiradas do aparelho, as amostras foram colocadas no gelo por 2 minutos para evitar a formação de dímeros. Na segunda etapa, foram adicionados 5µL de Tampão da enzima (Tampão 5X), 5µL de dNTPs (10 mM) e 1µL da enzima MMLV (200 U/µL), totalizando um volume final de 26µL. Esta mistura foi incubada no termociclador, mas em condições diferentes: 37°C por 1 hora e 85°C por 5 minutos.

#### 4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a amplificação das regiões gênicas de interesse dos dois *Alphavirus* foi utilizada a PCR, que utiliza a ação da enzima Taq polimerase para fazer a amplificação. Para a detecção de CHIKV foram utilizados dois protocolos, um para amplificar o gene codificador da glicoproteína *E1* (KUMAR et al., 2007) e o outro para amplificar o gene codificador da glicoproteína *E2* (PORTER et al., 2004). Para investigar uma possível circulação do MAYV foram padronizados três protocolos para a amplificação dos genes codificadores das proteínas *nsP1* (BRONZONI et al., 2005), a região de junção dos genes *E2/E3* (TALARMIN et al., 1998), e o gene *E1* (BARROS et al. 2018). Os protocolos utilizados estão descritos a seguir.

##### 4.4.1 PCR para amplificação do gene *E1* de CHIKV

Para amplificação do gene que codifica a glicoproteína *E1* de CHIKV foram utilizados os iniciadores DVRChk-F e DVRChk-R descritos por Kumar e colaboradores (2007) (Tabela 1). O produto final resultante é de 330 pares de base (pb).

**Tabela 1.** Iniciadores descritos por Kumar e colaboradores (2007) utilizados para amplificação da região de interesse do gene *E1* com suas localizações e tamanho do produto.

GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5'-3')	POSIÇÃO	PRODUTO
<i>E1</i>	DVRChk-F	ACCGGCGTCTACCCATTCATGT	10.237-10.258	330 pb
	DVRChk-R	GGGCGGGTAGTCCATGTTGTAGA	10.544-10.566	

Para um volume final de 25µl foram adicionados 2,5µL de Tampão 10X, 1,2µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,4µL de dNTP (10 mM), 0,2µl do primer *forward* – DVRChk-F (10 pmol/µL), 0,2µl do primer *reverse* - DVRChk-R (10 pmol/µl), 0,2µL de Taq DNA polimerase (2 U/µL), 17,3µL de água estéril e 3µL de cDNA para cada amostra. Após serem preparados, os reagentes foram incubados no termociclador *Thermal Cyclers (Amplitherm®)* nas seguintes condições: desnaturação inicial à 94°C por 5 minutos seguida de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 45 seg; anelamento à 58°C por 30 seg; extensão à 72°C por 1 minuto e uma extensão final à 72°C por 30 min.

#### 4.4.2 PCR para amplificação do gene *E2* de CHIKV

Porter e colaboradores (2004) desenvolveram uma *Nested*-PCR para a detecção do CHIKV com base na região do gene que codifica a glicoproteína *E2*. Na primeira etapa, os iniciadores JM1 e JM2 foram utilizados, amplificando um produto de 240 pb. Na segunda etapa, foram utilizados os iniciadores JM3 e JM4, gerando dessa vez, um produto de 200 pb. Os iniciadores e algumas informações adicionais estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Iniciadores descritos por Porter e colaboradores (2004) utilizados para amplificação da região de interesse do gene *E2* com suas localizações e tamanhos dos produtos.

GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5'-3')	POSIÇÃO	PRODUTO
<i>E2</i>	JM1-F	GCAGACGCAGAGAGGGCCAG	1.201 - 1.220	240 pb
	JM2-R	CGTGCTGCAAGGTAGTTCTC	1.440 - 1.421	
	JM3-F	GCTATTTGTAAGAAC GTCAG	1.221 - 1.240	200 pb
	JM4-R	TACCGTGCTGCGGTCGGGAA	1.420 - 1.401	

Para um volume final de 25µl, foram adicionados 2,5µl de tampão (10x), 1,2µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,5µl de dNTPs (10mM), 0,3µl de primer *forward* – JM1 (10 pmol/ µL), 0,3µl de primer *reverse* – JM2 (10 pmol/µl), 0,2µl de Taq DNA polimerase (2U/µl), 17,5µl de H<sub>2</sub>O estéril e 2,5µl de cDNA para cada amostra. Depois de preparados, os reagentes foram incubados no termociclador *Thermal Cyclers (Amplitherm®)* e submetidos às seguintes etapas: desnaturação inicial à 94°C por 3 min seguida de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 45 seg; anelamento à 55°C por 30 seg; extensão à 72°C por 1 min e uma extensão final à 72°C por 10 min. Foram utilizados 2,5µl do produto da primeira etapa em uma segunda reação de amplificação, dessa vez utilizando os iniciadores JM3 e JM4 e empregando os mesmos parâmetros e condições da primeira reação.

#### 4.5 Padronização de reações para detecção de MAYV

No decorrer deste trabalho foram padronizados no laboratório três protocolos para a detecção de MAYV. Para isso, foi realizada uma busca ativa por iniciadores descritos na literatura que amplificassem diferentes regiões genômicas, com a finalidade de ampliar o panorama de investigação deste vírus. A pesquisa levou em consideração critérios como: o tamanho dos produtos amplificados, a especificidade e o ano de construção do par de iniciadores.

Para a execução dos testes, foram utilizados controles positivos de MAYV cedidos por colaboradores da UFMG. Diferentes concentrações dos controles positivos (Puro, 1:10 e 1:100) foram usadas com o intuito de verificar o limite de detecção da reação. A quantidade de reagentes e as condições de temperatura e ciclagens utilizadas foram estabelecidas com base em adaptações do protocolo descrito por Bronzoni e colaboradores (2005). Em todos os

protocolos foram selecionadas e testadas diferentes temperaturas de anelamento. Estas temperaturas foram obtidas com base na média da temperatura *melting* ( $T_m$ ) dos iniciadores *forward* e *reverse*, sendo verificada através do programa *OligoAnalyzer*. Os protocolos utilizados serão descritos a seguir.

#### 4.5.1 Padronização de reação para amplificação dos gene *nsP1* de MAYV

Para amplificação do gene que codifica a glicoproteína *nsP1* foi empregada uma *Semi-Nested* PCR descrita por Bronzoni e colaboradores (2005), com a realização de três testes (T1-T3). Na primeira etapa, foram utilizados os iniciadores M2W e cM3W, gerando um produto de 434 pb. O produto da primeira etapa foi utilizado em uma segunda reação de amplificação que fez uso dos iniciadores nMAY e cM3W resultando em um produto final de 270 pb. Informações sobre estes iniciadores estão descritas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Iniciadores descritos por Bronzoni e colaboradores (2005) utilizados para amplificação da região de interesse do gene *nsP1* e tamanhos dos produtos.

GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5'-3')	PRODUTO
<i>nsP1</i>	M2W	YAGAGCDTTTTCGCAYSTRGCHW	434 pb
	cM3W	ACATRAANKGNGTNGTRTCRAANCCDAYCC	
	nMAY	GGAAGTTGGCCAAGGC	270 pb
	cM3W	ACATRAANKGNGTNGTRTCRAANCCDAYCC	

Foram realizados três testes com diferentes temperaturas de anelamento ( $T_a$ ), ( $T_1=53^\circ\text{C}$ ;  $T_2=57^\circ\text{C}$ ;  $T_3=58^\circ\text{C}$ ). A quantidade de reagentes e as demais condições de temperatura e ciclagem estão descritas a seguir: 2,5 $\mu\text{l}$  de tampão (10x), 1,2 $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50mM), 0,5 $\mu\text{l}$  de dNTPs (10mM), 0,3 $\mu\text{l}$  de primer *forward* – M2W (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ), 0,3 $\mu\text{l}$  de primer *reverse* – cM3W (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ), 0,2 $\mu\text{l}$  de Taq DNA polimerase (5U/ $\mu\text{l}$ ), 17 $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril e 3 $\mu\text{l}$  de cDNA para cada amostra. Depois de misturados, os reagentes foram incubados no termociclador *Thermal Cyclers* (*Amplitherm*®) e submetidos às etapas de desnaturação inicial à  $94^\circ\text{C}$  por 3 min seguida de 35 ciclos de amplificação nas seguintes condições: desnaturação à  $94^\circ\text{C}$  por 45 seg; anelamento nas três temperaturas  $T_1$ ,  $T_2$  e  $T_3$  por 45 seg; extensão à  $72^\circ\text{C}$  por 1 min e uma extensão final à  $72^\circ\text{C}$  por 10 min. Foram utilizados 3 $\mu\text{l}$  do produto da primeira etapa em uma segunda reação de amplificação com os iniciadores nMAY e cM3W utilizando os mesmos parâmetros e condições da primeira reação.

#### 4.5.2 Padronização de reação para amplificação da região de interseção entre os genes *E3/E2* de MAYV

Para amplificação da região de interseção entre os genes *E3/E2* foram realizados quatro testes (T1=55°C; T2=56°C; T3=57°C e T4=58°C), utilizando os iniciadores MAYF1 e MAYB2 descritos por Talarmin e colaboradores (1998), gerando um produto final de 462 pb. Informações sobre estes iniciadores estão descritas na tabela 4.

**Tabela 4.** Sequência dos iniciadores MAYF1 e MAYB2 descritos por Talarmin e colaboradores (1998) utilizados para investigar MAYV.

GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5'-3')	PRODUTO
<i>E3/E2</i>	MayF1	CTTCCCATGTTTCCAACCGAG	462 pb -
	MayB2	GCCAGGATAAAGTGTCCCATTTGTG	

Para uma reação com volume final de 25µl foram adicionados 2,5µl de tampão (10x), 1,2µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,5µl de dNTPs (10mM), 0,3µl de primer *forward* – MayF1 (10 pmol/µL), 0,3µl de primer *reverse* – MayB2 (10 pmol/µl), 0,2µl de Taq DNA polimerase (5U/µl), 17µl de H<sub>2</sub>O estéril e 3µl de cDNA para cada amostra. Depois de misturados, os reagentes foram incubados no termociclador *Thermal Cyclers (Amplitherm®)* e submetidos às etapas de: desnaturação inicial à 94°C por 3 min seguido de 35 ciclos de amplificação nas seguintes condições: desnaturação à 94°C por 45 seg; anelamento nas temperaturas T1, T2, T3 e T4 por 45 seg; extensão à 72°C por 1 min e uma extensão final à 72°C por 10 min.

#### 4.5.3 Padronização de reação para detecção do gene *E1* de MAYV

Com a finalidade de investigar MAYV por meio de uma região diferente das demais relatadas anteriormente, iniciadores específicos para amplificação do gene que codifica a glicoproteína *E1* foram desenhados no laboratório e estão descritos em Barros (2018). Estes foram denominados Maynu-F e Maynu-R e amplificam um produto de 579 pb (Tabela 5).

**Tabela 5.** Sequência de iniciadores desenhados no próprio laboratório para amplificação da região de interesse no gene *E1* com sua localização e tamanhos do produto.

INICIADOR	SEQUÊNCIA (5'-3')	GENE	PRODUTO
MaynuF	ATGTGGGGAGGTGCATACTG	E1	579 pb -
MaynuR	CATCGAAACGGGTATGTTGC		

Foram realizados cinco testes com diferentes temperaturas de anelamento (Ta), (T1=54°C, T2=55°C, T3=56°C, T4=57°C e T5=58°C). As demais condições de temperaturas, ciclagens e quantidade de reagentes foram adaptadas, baseadas no protocolo descrito por Bronzoni e colaboradores (2005) e, estão descritas a seguir. Para uma reação com volume final de 25µl foram adicionados 2,5µl de tampão (10x), 1,2µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,5µl de dNTPs



(10mM), 0,3µl de *Primer forward* – Maynu-F (10 pmol/ µL), 0,3µl de *Primer reverse* – Maynu-R (10 pmol/µl), 0,2µl de Taq DNA polimerase (5U/µl), 17µl de H<sub>2</sub>O estéril e 3µl de cDNA para cada amostra. Depois de misturados, os reagentes foram incubados no termociclador *Thermal Cyclers (Amplitherm®)* e submetidos às etapas de: desnaturação inicial à 94°C por 3 min seguido de 35 ciclos de amplificação nas seguintes condições: desnaturação à 94°C por 45 seg; anelamento nas temperaturas (T1-T5) por 45 seg; extensão à 72°C por 1 min e uma extensão final a 72°C por 10 min.

#### **4.6 Visualização dos Produtos Amplificados**

Os produtos das PCRs juntamente com um marcador de peso molecular (Ladder 100pb) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corados com GelRed®. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal preenchida com tampão TBE 1x (tris + ácido bórico + EDTA) em corrente de 120 V por 40 min. Em seguida, os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados no transiluminador L-PIX (Loccus Biotecnologia) para identificação viral.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todo o ano de 2017 foram coletadas 347 amostras de pacientes com suspeita de infecção por arbovírus. Comparado com as amostras obtidas pelo BIOMIC no ano de 2016 (n=231), houve um aumento de aproximadamente 150%. Desse total, 184 amostras foram positivas para a presença de anticorpos e/ou do RNA do CHIKV. Em relação ao ano anterior onde 71 amostras foram positivas por métodos sorológicos e/ou moleculares, foi possível observar uma elevação de 259,15% na taxa de positividade do CHIKV, o que pode sugerir que houve um aumento na circulação do vírus no Piauí.

Esses achados são apoiados pelos dados apresentados pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, os quais mostram que a partir de 2015, o Piauí teve um aumento vertiginoso, cerca de 20 vezes, no número de casos prováveis de infecções por CHIKV (BRASIL, 2016; BRASIL, 2017). Em conjunto, esses dados revelam que o CHIKV se disseminou de uma forma rápida e intensa no Estado nos anos seguintes à sua introdução no país em 2014 (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014; NUNES et al., 2015).

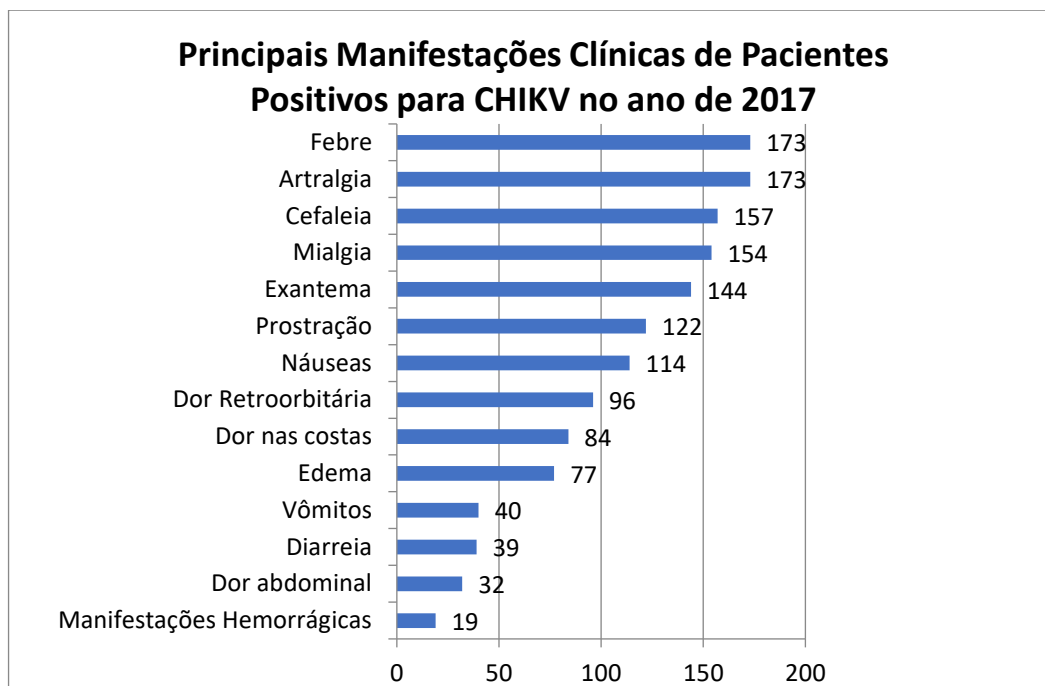
Informações referentes ao gênero e à faixa etária foram analisadas em todas as amostras que foram positivas para CHIKV em um ou ambos os métodos. Em relação ao gênero, foi possível observar uma ocorrência maior no sexo feminino (73,37%). Achados semelhantes foram relatados em outros países americanos (CARRERA et al., 2017; CARRILLO-HERNÁNDEZ et al., 2018; GENDEREN et al., 2016; HUIITS et al., 2018), e também no Brasil (BRAGA et al., 2017; CARDOSO, 2017; SOUZA et al., 2017). No entanto, há relatos que mostram que os homens também podem ser o grupo mais acometido. Em um trabalho soroepidemiológico realizado na ilha Mayotte no ano de 2006, Sissoko e colaboradores (2008) identificaram uma maior soroprevalência de anticorpos em homens. De acordo com a literatura, diversos fatores podem estar relacionados a essas diferenças quanto a prevalência da infecção em homens e mulheres em diferentes países, entre eles: hábitos, estilos de vida e comportamentos (CARRILLO-HERNÁNDEZ et al., 2018; GENDEREN et al., 2016; SERGON et al., 2007; SISSOKO et al., 2008).

Com relação à idade, a média foi de 39,6 anos e o grupo etário mais acometido foi o pertencente à faixa de 30-39 anos (22,83%). Além disso, pôde-se perceber também que a maior parte dos casos, ~54,9%, ocorreram em indivíduos com idade entre 20 e 49 anos, que constituem o grupo de adultos jovens. O acometimento desse grupo populacional, como também é visto em indivíduos de outras faixas etárias, pode resultar numa redução da qualidade de vida, além de provocar impactos sociais e econômicos que se caracterizam pelos elevados custos com hospitalização, manejo e tratamento dos pacientes acometidos e pela incapacidade para a realização de atividades cotidianas e/ou laborais (SOUMAHORO et al., 2009; SOUMAHORO et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2015).

Outros estudos mostraram padrões similares aos encontrados aqui (ALVA-URCIA et al., 2017; BARROS, 2018; BRAGA et al., 2017; CARDOSO, 2017; CARRERA et al., 2017; GENDEREN et al., 2016). Contudo, também foi possível observar estudos nos quais houveram uma maior ocorrência de casos em faixas etárias menores e que apresentaram uma média de idade menor. Langsjoen e colaboradores (2016) encontraram uma média de idade de 16,5 anos e a faixa etária de 6 – 14 anos como a mais acometida. Carrillo-Hernández e colaboradores (2018) relataram uma média de idade de 21,1 anos. Curiosamente, a faixa etária de 0 – 10 anos foi a que registrou mais casos, 18 de um total de 47 casos positivos, correspondendo a aproximadamente 38,3%. Um resultado divergente foi encontrado por Huits e colaboradores (2018). Nesse trabalho, a média de idade dos pacientes foi de 50,2 anos e a faixa etária mais acometida foi a de 41 – 60 anos.

É importante notar que a distribuição etária e também a distribuição entre os sexos dos casos de CHIKV, como pode ser observado, variam entre os diversos estudos uma vez que, esses estudos diferem em seu desenho, espaço amostral e composição da população. No entanto, em alguns casos pode ser visto que os resultados encontrados em uma região podem até mesmo não refletir a demografia local. Genderen e colaboradores (2016), por exemplo, encontraram uma razão homem/mulher e também a presença de indivíduos com menos de 15 anos menores que as frequências observadas para a população surinamesa em geral.

No tocante aos sinais e sintomas apresentados pelos pacientes positivos nos testes sorológicos e moleculares, os mais incidentes foram: febre e artralgia (173 – 94,02%), cefaleia (157 – 85,33%), mialgia (154 – 83,69%), exantema (137 – 78,26%) e prostração (114 – 66,30%). Essas e outras manifestações são mostradas na **Figura 7**.



**Figura 7.** Principais manifestações clínicas dos pacientes positivos para CHIKV nos testes sorológicos e moleculares no ano de 2017.

Em comparação com estudos realizados em outros países da América Latina, basicamente as mesmas manifestações clínicas foram relatadas, no entanto, foi possível observar variações em suas frequências. Com relação à incidência de sinais e sintomas clínicos, os resultados encontrados aqui corroboram com os descritos no Panamá, embora tenha sido observado uma variação nas frequências (CARRERA et al., 2017). Também foi possível observar estudos onde a artralgia teve uma maior incidência do que a febre como no Suriname (GENDEREN et al., 2016) e em Aruba (HUIITS et al., 2018).

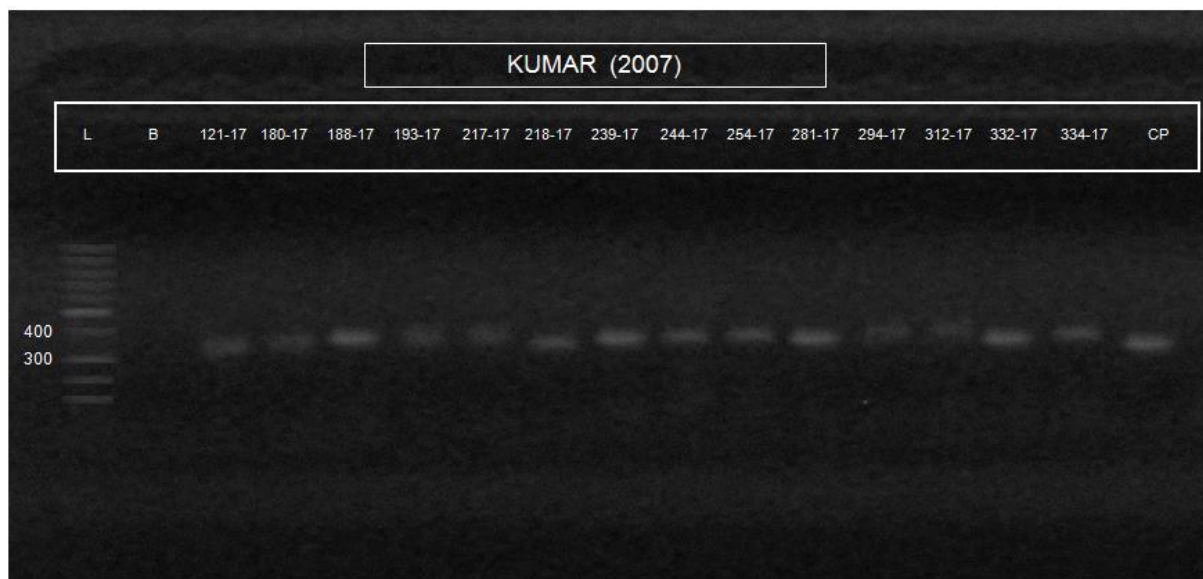
Curiosamente, em um estudo realizado em um hospital da República Dominicana, sintomas comuns da infecção pelo CHIKV, como a artralgia e a mialgia, apresentaram uma baixa frequência nos pacientes positivos, 20% e 13,3%, respectivamente (LANGSJOEN et al., 2016). Apesar disso, esses sintomas foram considerados de valor diagnóstico, uma vez que eles foram específicos de pacientes com Febre Chikungunya. Segundo os autores, a menor frequência desses sintomas pode ser explicada pela técnica de amostragem do estudo, no qual foram incluídos todos os pacientes para os quais havia sido solicitado exame de sangue, independente da condição clínica apresentada, diferindo assim, deste e de outros trabalhos onde foram incluídos os pacientes com suspeita clínica de infecção por CHIKV e/ou por outros arbovírus. Essa baixa frequência de sintomas tão característicos da Febre Chikungunya também já foi vista em outros trabalhos. Por exemplo, em um outro estudo, realizado nas Filipinas, os autores encontraram uma frequência de apenas 45% de artralgia em pacientes com Febre Chikungunya (YOON et al., 2015).

Em relação a trabalhos realizados no Brasil, houve diferenças nos sintomas mais frequentes entre este trabalho e o descrito por Souza e colaboradores (2017) no município do Rio de Janeiro, onde artralgia e mialgia (100%), febre e cefaleia (90%), prostração e calafrios (70%) foram as manifestações clínicas mais frequentes. Uma possível explicação para essas altas frequências é o tamanho amostral do estudo: apenas 10 amostras positivas por RT-qPCR e que foram sequenciadas, tiveram seus dados clínicos e epidemiológicos analisados.

Em um outro trabalho, Souza e colaboradores (2018) investigaram surtos distintos, temporal e espacialmente, ocorridos nos Estados do Amapá em 2014 e 2015 e no Rio de Janeiro em 2016. As manifestações clínicas mais frequentes foram semelhantes em ambos os surtos, com febre, artralgia, mialgia, cefaleia, prostração e exantema configurando entre os principais sintomas. Em um estudo anterior realizado pelo grupo de pesquisa do laboratório BIOMIC em 2016, foi observado que febre, artralgia, cefaleia, mialgia e exantema também foram os sintomas com a maior frequência entre os pacientes com infecção pelo CHIKV confirmada por RT-PCR (CARDOSO, 2017).

Manifestações clínicas mais raras, como manifestações hemorrágicas, também foram observadas em uma baixa frequência, 10,33%, embora essa taxa tenha sido maior que a vista em outros surtos (ECONOMOPOULOU et al., 2009; MATTAR et al., 2015; NKOGHE et al., 2012; STAIKOWSKY et al., 2009). Neste estudo, os sinais hemorrágicos observados se restringiram a sangramento nasal, gengivorragia e petéquias. No entanto, o espectro de manifestações hemorrágicas em pacientes com infecção pelo CHIKV é amplo e pode incluir além destes sinais, hematêmese, hematoma, hematúria, hemoptise, sangramento gastrointestinal, sangramento vaginal anormal e sangue nas fezes (BORGHERINI et al., 2007; ECONOMOPOULOU et al., 2009; SAHADEO et al., 2015; STAIKOWSKY et al., 2009).

Adicionalmente, 50 amostras foram selecionadas com base no período do início dos sintomas, principais manifestações clínicas e resultados de testes sorológicos para a realização de testes moleculares. Em seguida, elas foram submetidas à extração de RNA viral e testadas por RT-PCR para CHIKV utilizando os protocolos descritos por Porter e colaboradores (2004) e Kumar e colaboradores (2007). No total, 14 amostras foram positivas para a detecção de material genético viral, (Figura 8). As informações clínico-laboratoriais dessas amostras são mostradas na tabela 6.



**Figura 8.** Amostras positivas para a presença do RNA de CHIKV. Detecção realizada através de uma adaptação do protocolo de RT-PCR descrito por Kumar e colaboradores (2007). Tamanho esperado do produto: 330 pb. L: Ladder; B: Branco; CP: Controle Positivo.

**Tabela 6.** Descrição das amostras positivas para CHIKV por RT-PCR quanto ao sexo, idade, dias de sintomas, testes sorológicos e moleculares e manifestações clínicas. Não Realizado (NR); positivo (+); negativo (-); Inconclusivo (INC). Adaptada de Barros (2018).

Amostra	Sexo	Idade	Dia de Sintomas	DENV IgM	DENV IgG	DENV PCR	CHKV IgM	CHKV IgG	CHKV PCR	PCR MAYV	Manifestações Clínicas (Fase Aguda)
121-17	F	34	2	-	+	-	NR	NR	+	-	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, prostração, vômitos, exantema e edema articular
180-17	M	34	2	-	NR	-	NR	NR	+	-	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, náuseas, dor nas costas e artrite
188-17	F	37	3	-	+	-	NR	NR	+	-	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, prostração e edema articular
193-17	F	40	5	-	NR	-	-	NR	+	-	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, diarreia, náuseas, prostração, dor retroorbitaria.
217-17	F	66	4	-	-	-	+	NR	+	-	Febre, cefaleia, artralgia, -náuseas, mialgia, prostração, diarreia, exantema, dor abdominal e edema articular
218-17	F	35	3	-	+	-	NR	NR	+	-	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, náuseas, prostração, exantema e edema articular
239-17	F	36	3	+	NR	-	INC	-	+	-	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, exantema, dor nas costas e petéquias
244-17	F	68	5	+	NR	-	+	-	+	-	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, dor retro-orbitária, exantema, náuseas e dor nas costas
254-17	F	66	5	-	NR	-	-	NR	+	-	Cefaleia, náuseas, exantema e edema articular
281-17	M	7	5	-	NR	-	+	NR	+	-	Febre, artralgia, mialgia, dor retro-orbitária, náuseas, vômitos e dor nas costas
294-17	F	12	5	-	-	-	-	+	+	-	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, náuseas e dor nas costas
312-17	F	85	5	-	+	-	+	NR	+	-	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, náuseas
332-17	M	13	4	-	-	-	-	NR	+	-	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, dor retro-orbitária, náuseas, vômitos, prostração, exantema,
334-17	F	45	4	-	-	-	-	NR	+	-	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, dor retro-orbitária, náuseas, prostração, exantema, edema articular

Dessas amostras, sete foram selecionadas com base nas manifestações clínicas e enviadas para o sequenciamento parcial dos genes *E1* e *E2*. As sequências obtidas juntamente com outras seis obtidas no ano de 2016 pelo laboratório foram comparadas com outras sequências do CHIKV depositadas no *GenBank* através da ferramenta *Nucleotide BLAST*. Em seguida, foi realizada uma análise filogenética destas sequências com outras sequências representantes dos três genótipos do CHIKV disponíveis no *GenBank*. O resultado mostrou que os isolados piauienses pertencem ao genótipo ECSA e que eles apresentaram mais de 99% de homologia com isolados dos Estados de Alagoas, Bahia, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro e Sergipe (manuscrito submetido para publicação).

A correta caracterização molecular da estirpe do CHIKV responsável por um surto aliada com a caracterização dos aspectos clínicos dos pacientes acometidos se mostra como uma estratégia relevante para avaliar os potenciais impactos econômicos e na qualidade de vida de populações afetadas (LANGSJOEN et al., 2016). Portanto, o monitoramento das manifestações clínicas dos pacientes acometidos por CHIKV é uma atividade fundamental para a avaliação da doença em humanos (KASHYAP et al., 2010). Neste sentido, com o objetivo de avaliar a evolução clínica da infecção pelo CHIKV foi feito um acompanhamento dos pacientes que foram positivos para a detecção do RNA viral.

Todas as amostras positivas para a presença do RNA foram selecionadas para o acompanhamento da evolução clínica através de pesquisa telefônica. Para fazer esse acompanhamento um novo formulário foi desenvolvido no laboratório com base em estudos que também avaliaram a evolução clínica de indivíduos acometidos pelo CHIKV (GERARDIN et al., 2011; JAVELLE et al., 2015; SCHILTE et al., 2013) e aplicado aos pacientes (Anexo III). Do total de pacientes positivos para a detecção do RNA viral, apenas 12 pacientes foram entrevistados. Os outros dois pacientes foram excluídos, pois não foi possível contactá-los. Os resultados são mostrados na tabela 7.



**Tabela 7.** Caracterização do tempo de persistência das manifestações e descrição das manifestações crônicas nos indivíduos com infecção pelo CHIKV confirmada por RT-PCR.

<b>Amostra</b>	<b>Idade</b>	<b>Dias de Sintomas</b>	<b>Tempo de persistência dos Sintomas</b>	<b>Manifestações Clínicas (Fase Crônica)</b>
121-17	36	2	~ 4 meses	Dores nos punhos e joelhos
180-17	34	2	~ 2 meses	Dores nas mãos e joelhos
188-17	43	3	~ 4 meses	Dores nas costas, nos dedos das mãos, punhos, joelhos, tornozelos (com edema) e pés
217-17	66	4	~ 6 meses	Dores nos punhos, joelhos, tornozelos e pés
218-17	35	3	~ 1 semana	Sem sinais e sintomas
239-17	36	3	~ 1 mês	Dores nos dedos das mãos, punhos, cotovelos joelhos e tornozelos
244-17	68	5	~ 3 meses	Dores nos dedos das mãos, punhos, joelhos e tornozelos.
281-17	7	5	~ 15 dias	Sem sinais e sintomas
294-17	12	5	~ 2 meses	Dores nos punhos, joelhos e tornozelos.
312-17	85	5	~ 5 meses	Dores nas mãos, punhos, cotovelos, ombros, joelhos e tornozelos.
332-17	13	4	~ 4 meses	Dores nas mãos, punhos, ombros, joelhos, tornozelos e pés.
334-17	46	4	~ 5 meses	Dores nos joelhos, tornozelos, pés e dedos dos pés

O resultado do inquérito telefônico mostrou que 58,34% dos pacientes RT-PCR positivos desenvolveram uma infecção crônica (07), 25% (03) se apresentaram na fase subaguda da infecção e 16,66% (02) tiveram uma infecção aguda (Tabela 9). De acordo com dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, essa taxa de cronicidade vem se mostrando estável aqui no Piauí. Considerando as amostras positivas para CHIKV através de RT-PCR dos anos de 2016 e 2017 foi observado que 60% delas evoluíram para a fase crônica. Adicionalmente, fazendo-se uma análise estratificada dos dados do laboratório e levando-se em conta apenas os pacientes positivos do ano de 2016, aproximadamente 63,6% deles apresentaram uma doença crônica (BARROS, 2018).

Em comparação com outros estudos, foi possível observar uma semelhança com o trabalho de Schilte e colaboradores (2013), onde aproximadamente 60% dos pacientes evoluíram para a fase crônica durante o surto ocorrido em Reunião em 2006. Outros estudos realizados em Reunião também encontraram valores similares na taxa de persistência de manifestações em pacientes infectados pelo CHIKV da linhagem IOL (BORGHERINI et al., 2008; SISSOKO et al., 2009). Peters e colaboradores (2018), entretanto, relataram uma persistência de artralgia em 44% dos pacientes infectados pelo CHIKV genótipo Asiático durante o surto de 2013-2014 ocorrido na parte holandesa da ilha de Saint Martin. De acordo com os autores, essa variação na persistência de manifestações crônicas observada entre os diferentes estudos pode ser explicada por alguns fatores entre os quais, diferenças quanto à estirpe do CHIKV infectante, inclusive entre isolados do mesmo genótipo e fatores específicos da população.

Em relação ao gênero, foi possível observar que, assim como no estudo de um modo geral, a maioria dos pacientes que apresentaram persistência de sintomas eram mulheres (85,72%). Sissoko e colaboradores (2009) também relataram uma maior persistência dos sintomas em mulheres. Dentre essas mulheres que evoluíram cronicamente, é interessante destacar a paciente 217-17. A paciente, na época com 66 anos, não tinha histórico de comorbidades. Apresentou uma sintomatologia clássica de arbovirose e teve o diagnóstico de CHIKV confirmado por RT-PCR. Depois da fase aguda, a paciente buscou um acompanhamento médico especializado. Os principais sintomas apresentados após a fase aguda foram artralgia simétrica e recidivante, sinovite com derrame articular bilateral nas mãos, punhos, ombros, tornozelos e pés, tendinopatia bilateral e edema periarticular que persistiram por aproximadamente 6 meses (SILVA et al., 2019).

Uma possível explicação para o desenvolvimento de artralgia persistente é o fato da paciente ser idosa. Os idosos (pessoas com mais de 65 anos), fazem parte do grupo de indivíduos que são mais suscetíveis ao desenvolvimento de doença crônica juntamente com os recém-nascidos, indivíduos imunocomprometidos e indivíduos que apresentam comorbidades, como o diabetes melito e a hipertensão (FOX; DIAMOND, 2016; STAPLES;

FISCHER, 2014). Porém, outros relatos identificaram que uma idade acima de 40 anos (DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012) ou igual ou maior que 45 anos (SISSOKO et al., 2009) se constituía como um fator de risco para a persistência de manifestações caracterizando assim, a fase crônica.

Curiosamente, os pacientes 121-17 e 332-17 que à época do estudo tinham 36 e 13 anos, respectivamente, também tiveram uma evolução para a fase crônica da doença. Manifestações persistentes da infecção pelo CHIKV em pessoas mais jovens não são comuns. No entanto, alguns estudos já puderam observar casos persistentes em indivíduos mais jovens (GERARDIN et al., 2011; PETERS et al., 2018), inclusive com este grupo etário sendo uma parte representativa dos casos (GERARDIN et al., 2011).

Em relação a manifestações neurológicas, sabe-se que o CHIKV é um vírus que usualmente, não se caracteriza por provocar uma doença neurológica. Entretanto, evidências recentes têm destacado o potencial neuropatogênico do vírus e uma ampla variedade de doenças neurológicas foram associadas à infecção (BANDEIRA et al., 2016; ECONOMOPOULOU et al., 2009; MEHTA et al., 2018). A maior frequência de doenças neurológicas está relacionada ao Sistema Nervoso Central (SNC) (77,3%), seguida do Sistema Nervoso Periférico (SNP) (13,4%) e mista (9,4%) (MEHTA et al., 2018).

Embora menos comum, as manifestações periféricas da infecção são variadas e incluem Neuropatia Periférica, Neuropatia Axonal Motora Aguda, Neuropatia Axonal Motora e Sensorial Aguda, entre outras. Neste trabalho, foi identificado um caso de acometimento do SNP. A paciente 217-17, que teve artralgia persistente, também desenvolveu Polineuropatia Periférica Padrão Axonal Sensitivo-Motora nas mãos e nos pés, confirmada por Eletroneuromiografia e ficou incapacitada para a realização de atividades cotidianas. Ela foi submetida a tratamento com Prednisolona, Metotrexato e Amitriptilina e teve uma remissão dos sintomas seis meses após o início do tratamento, mas ainda seguiu com o uso dos medicamentos e fazendo avaliações médicas periódicas.

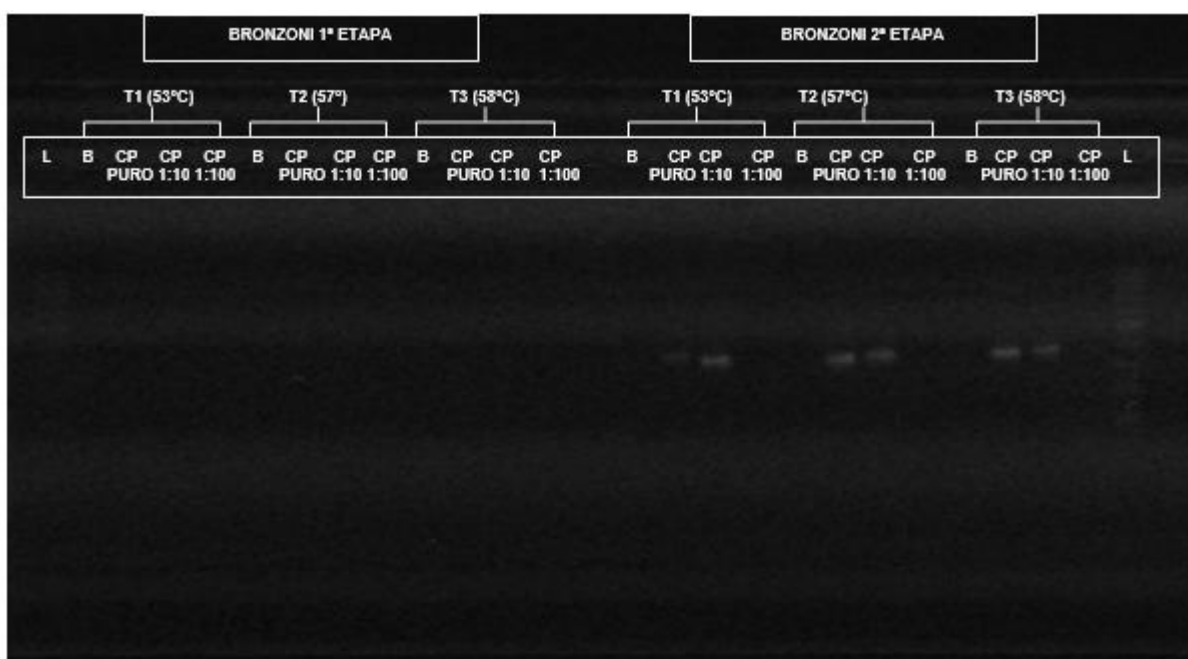
Neste estudo, portanto, foi possível identificar que além das manifestações mais comuns da infecção, como febre, artralgia, cefaleia, mialgia e exantema, a infecção pelo CHIKV pôde ser associada a manifestações clínicas mais atípicas, como manifestações hemorrágicas e distúrbios no SNP. Esses dados reforçam a importância de se manter um sistema de vigilância apto a identificar tanto arbovírus endêmicos como novos e que permita realizar uma caracterização clínica mais confiável das infecções arbovirais, auxiliando desse modo, o delineamento de novas estratégias de prevenção.

Adicionalmente, este trabalho também investigou uma possível circulação do MAYV, um arbovírus que provoca uma doença semelhante à causada pelo CHIKV, em amostras clínicas sugestivas no Piauí, através de técnicas moleculares. Para isso, três protocolos de RT-PCR foram padronizados no laboratório. Foram selecionados inicialmente, dois pares de

iniciadores descritos na literatura (TALARMIN et al., 1998; BRONZONI et al., 2005), além de outro par que foi desenhado no laboratório com a finalidade de ampliar a capacidade de detecção e dar continuidade à investigação de MAYV, além de permitir uma futura caracterização molecular de um possível isolado do MAYV (BARROS, 2018).

O primeiro protocolo de RT-PCR consiste de uma adaptação da reação de Semi-Nested PCR descrita por Bronzoni e colaboradores (2005) utilizada para a detecção de DENV. Utilizou-se as mesmas quantidades de reagentes, mudando-se apenas os iniciadores em suas duas etapas. Todos os testes realizados utilizaram controle positivo puro e nas diluições 1:10 e 1:100, como pode ser observado na figura 9. Na primeira etapa da reação, realizou-se um teste na temperatura de anelamento descrita pelos autores, 53°C (T1), além de testes nas temperaturas de 57°C (T2) e 58°C (T3). Essas temperaturas maiores foram escolhidas, pois os iniciadores apresentavam T<sub>m</sub> média muito maior do que a temperatura de anelamento usada pelos autores

Na segunda etapa da reação, utilizou-se uma pequena alíquota do produto amplificado na primeira etapa. Em seguida, o produto foi submetido às mesmas condições de temperatura e ciclagem utilizando um segundo par de iniciadores (cM3W- utilizado na primeira etapa; e nMAY- um novo iniciador).



**Figura 9.** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos três testes (T1: 53°C, T2: 57°C e T3: 58°C) na primeira e segunda etapas, com controles positivos de MAYV (Puro, 1:10 e 1:100), utilizando uma adaptação do protocolo descrito por Bronzoni e colaboradores (2005) para o gene *nsP1*, L: Marcador de peso molecular; B: Branco; CP: Controles Positivos.

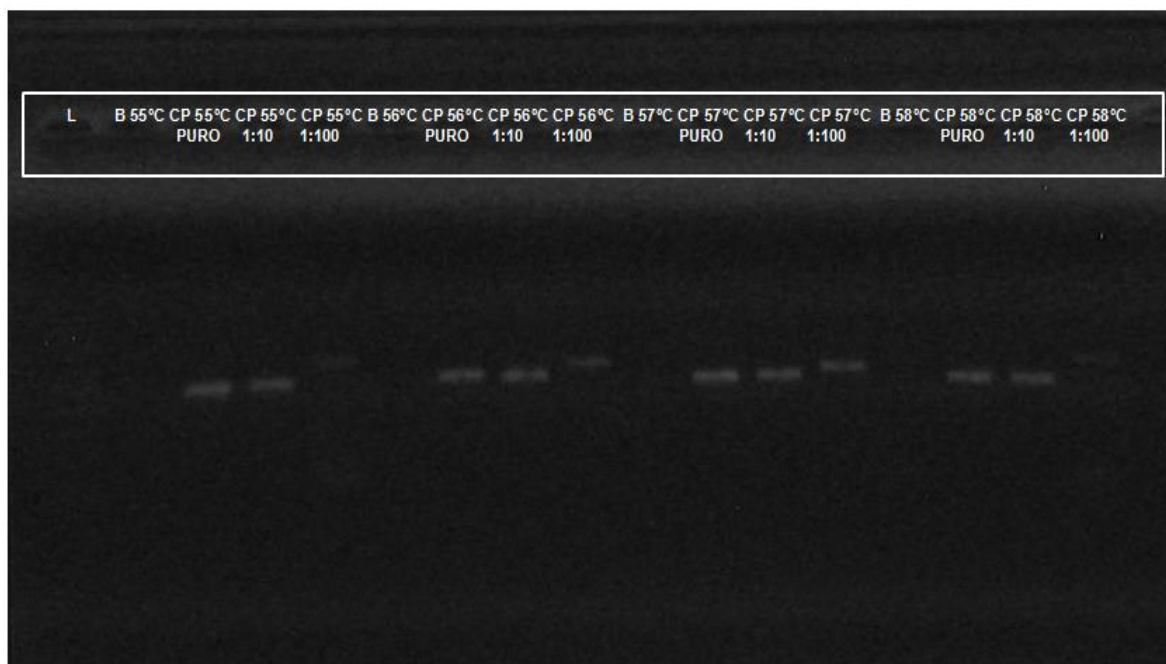
Conforme ilustrado na figura 9, os resultados dos testes na primeira etapa demonstraram que não houve amplificação do produto esperado com o controle positivo puro

e suas respectivas diluições (1:10, 1:100), nas temperaturas de anelamento testadas (T1, T2 e T3). Simionatto e colaboradores (2005) também relataram uma não amplificação na primeira etapa. No entanto, essa ausência “aparente” de produto amplificado não significa, na maioria das vezes, ausência de fato. Na verdade, existe um arrasto que não é visualizado, talvez por falta de especificidade (MATIOLI, 2004). Uma outra possível explicação para esse resultado reside na característica dos iniciadores utilizados. Os iniciadores são degenerados e quando esse tipo de iniciador é empregado, cada um pode se comportar de uma forma diferente. Assim, a ineficiência provocada pela  $T_m$  diferente entre os iniciadores, além de incompatibilidades entre os sítios de ligação aos iniciadores e os iniciadores pode levar a uma distorção da verdadeira abundância de alvos de DNA (GREEN; VENKATRAMANAN; NAQIB, 2015).

Ainda de acordo com o exposto na figura 9, os resultados dos testes na segunda etapa demonstraram que ocorreu amplificação do produto esperado nas temperaturas de anelamento ( $T_a$ ) testadas, com o controle positivo puro e na diluição 1:10. Diante dos dados, este protocolo foi otimizado empregando a  $T_a$  à 53°C para ambas as etapas, definida a partir da temperatura melting ideal para os iniciadores. Adicionalmente, este protocolo adaptado foi empregado em 19 amostras clínicas escolhidas com base na sintomatologia apresentada, entretanto, não foram identificadas amostras positivas.

Outros estudos também usaram o protocolo descrito por Bronzoni e colaboradores (2005) e obtiveram sucesso na identificação do RNA viral. Coimbra e colaboradores (2007) conseguiram identificar três casos positivos de MAYV em São Paulo, importados do Mato Grosso do Sul, e Zuchi e colaboradores (2014) relataram a detecção do RNA viral em amostras de 15 pacientes, sendo que 12 destas, estavam co-infectadas com o DENV-4 durante uma epidemia de DENV no Mato Grosso.

O segundo protocolo de RT-PCR, descrito por Talarmin e colaboradores (1998), foi usado para a detecção de MAYV com base na região de junção dos genes *E3/E2*. Foram realizados testes baseados na temperatura de anelamento descrita pelo autor ( $T_1$ : 55°C) e baseado na média da Temperatura melting ( $T_m$ ) dos iniciadores, mais testes foram realizados nas temperaturas  $T_2$ : 56°C,  $T_3$ : 57°C e  $T_4$ : 58°C utilizando-se o controle positivo puro e nas diluições 1:10 e 1:100. Os resultados dos testes podem ser vistos na Figura 10.



**Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos quatro testes (T1: 55°C, T2: 56°C, T3: 57°C e T4: 58°C), com controles positivos de MAYV (Puro, 1:10 e 1:100), utilizando uma adaptação do protocolo descrito por Talarmin e colaboradores (1998) para a região de interseção dos genes *E3/E2*, L: Marcador de peso molecular; B: Branco; CP: Controles Positivos.

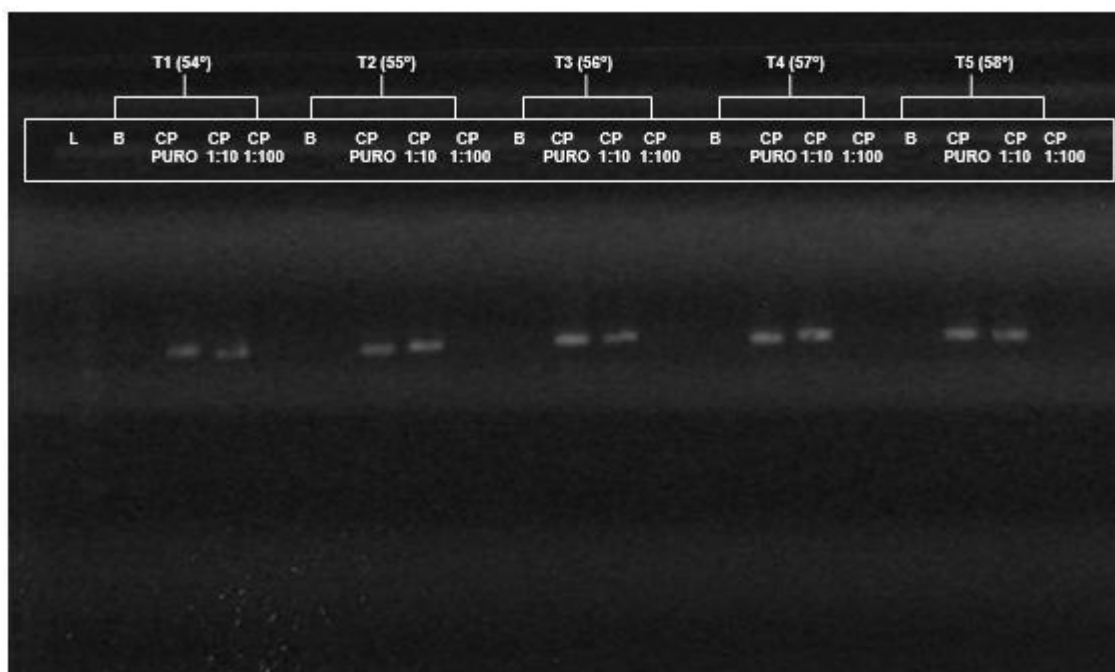
Conforme ilustrado na Figura 10, os resultados dos testes demonstraram que houve amplificação satisfatória do produto esperado com o controle positivo puro e na diluição 1:10 nas temperaturas de anelamento testadas (T1, T2, T3 e T4). No entanto, os testes realizados com o controle positivo na diluição 1:100 nas temperaturas de 55°C e 58°C (T1 e T4) não apresentaram a formação de uma banda nítida, indicando uma possível ineficiência da reação na concentração 1:100 nessas temperaturas de anelamento testadas (MATIOLI, 2004). Oliveira (2007) e Vera, Segovia e Torres (2017) também relataram essas diferenças em relação à temperatura de anelamento e também em relação à concentração dos controles no processo de padronização de PCR. Diante dos resultados obtidos, este protocolo foi otimizado empregando a  $T_a$  à 57°C, definida a partir da temperatura melting ideal para os iniciadores.

No estudo de Barros (2018), realizado no Estado do Piauí, também foi utilizado o protocolo descrito por Talarmin e colaboradores (1998). Neste trabalho, a autora conseguiu identificar uma amostra sugestiva de infecção por MAYV utilizando esse protocolo. A amostra foi obtida em 2015 pelo nosso grupo de pesquisa e havia sido positiva para a detecção do DENV-2 (GARCÊS, 2016), indicando um possível caso de co-infecção. A paciente apresentou manifestações típicas, como febre, cefaleia, artralgia, mialgia, vômito, náuseas e fraqueza muscular, além de manifestar comprometimento neurológico que se caracterizou por paralisia dos membros superiores e inferiores.

Casos de co-infecções por DENV e MAYV já foram registrados no país. Zuchi e colaboradores (2014) reportaram 12 casos de indivíduos co-infectados por DENV-4 e MAYV,

durante um grande surto de DENV ocorrido no Estado de Mato Grosso no ano de 2012. Todos os pacientes co-infectados apresentaram sintomatologia clássica de infecção arboviral. Embora um paciente tenha relatado tontura, não houve sinais neurológicos mais evidentes, diferente do que foi visto no Piauí. Assim, esse relato prévio junto com o achado de Barros (2018) sugere uma possível circulação silenciosa de MAYV durante surtos ou epidemias de outros arbovírus e reforça a importância de se manter uma vigilância laboratorial adequada apta a identificar infecções por arbovírus menos comuns.

Adicionalmente, um novo protocolo foi otimizado utilizando o par de iniciadores desenhados no laboratório BIOMIC (BARROS, 2018) com o objetivo de aumentar a capacidade de detecção do MAYV. Foram realizados testes com controles positivos puros e nas diluições 1:10 e 1:100 em diferentes temperaturas de anelamento, como mostra a Figura 11.



**Figura 11.** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos cinco testes (T1: 54°C, T2: 55°C, T3: 56°C, T4: 57°C e T5: 58°C), com controles positivos de MAYV (Puro, 1:10 e 1:100), utilizando o protocolo desenvolvido e padronizado por Barros (2018) para o gene *E1*, L: Marcador de peso molecular; B: Branco; CP: Controles Positivos.

Conforme ilustrado na Figura 11, os resultados dos testes demonstraram que houve amplificação satisfatória do produto esperado com o controle positivo puro e na diluição de 1:10 nas temperaturas de anelamento testadas (T1, T2, T3, T4 e T5). Contudo, os testes realizados com o controle positivo na diluição 1:100 não apresentaram amplificação. Conforme visto na padronização do protocolo de Talarmin e colaboradores (1998), um dos fatores que podem explicar essa não amplificação é uma provável ineficiência da reação nessa diluição (1:100) (MATIOLI, 2004). Com base nos resultados obtidos e também na  $T_m$

média do par de iniciadores a temperatura de 57°C foi escolhida como a temperatura de anelamento.

Testes realizados no laboratório BIOMIC empregaram esse protocolo na investigação de 100 amostras clínicas suspeitas do ano de 2017. No entanto, nenhuma das amostras testadas foram positivas. Apesar disso, o desenvolvimento e a implementação desse novo protocolo de RT-PCR se apresentam como uma alternativa válida para a vigilância desse arbovírus tanto em áreas endêmicas como em não-endêmicas a fim de se avaliar a sua circulação concomitante com a de outros arbovírus epidemiologicamente mais importantes.

Baseado nos dados apresentados, observa-se que a utilização de métodos moleculares e sorológicos permite conhecer a disseminação de arbovírus emergentes, como o CHIKV, no Piauí. Além disso, dados adicionais gerados pelo sequenciamento e pela análise filogenética dos isolados de CHIKV combinados com uma correta descrição clínica permitem uma melhor caracterização de estirpes do CHIKV e suas relações com manifestações clínicas mais persistentes e/ou mais graves. O desenvolvimento e o emprego de testes moleculares para o diagnóstico de arbovírus menos comuns, como o MAYV, são estratégias importantes para a correta diferenciação entre arbovírus que induzem manifestações clínicas muito similares, como as causadas pelo MAYV e pelo CHIKV. Em resumo, essas informações poderão auxiliar a Vigilância Epidemiológica estadual a estabelecer um sistema de vigilância ativo apto a identificar e a monitorar a dinâmica de circulação de arbovírus no Estado.



## 6 CONCLUSÃO

- Este trabalho identificou, a partir da combinação entre técnicas sorológicas e moleculares, a circulação e a disseminação do CHIKV no norte do Estado do Piauí no ano de 2017;
- Foi observada uma maior incidência de casos positivos para CHIKV, com base em critérios sorológicos no ano de 2017, em comparação ao registrado pelo BIOMIC no ano de 2016, corroborando com os resultados disponibilizados no Boletim Epidemiológico da Secretaria de Saúde do Estado do Piauí bem como, no Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde;
- A RT-PCR foi capaz de detectar amostras positivas para CHIKV que não haviam sido positivas por outros testes, mostrando a sensibilidade e a eficiência desta técnica;
- As manifestações clínicas mais prevalentes nos indivíduos positivos para CHIKV no ano de 2017 foram a febre e a artralgia, acompanhados por cefaleia e mialgia. No entanto, manifestações menos comuns também foram observadas. Neste estudo, sinais hemorrágicos foram relatados em 10,33% dos pacientes, uma frequência representativa em comparação com outros trabalhos;
- A maioria dos casos positivos tanto por métodos sorológicos, como por métodos moleculares, ocorreu em adultos jovens, entre 20 e 49 anos, o que pode ter reflexos sociais e econômicos resultantes dos custos com a saúde dos pacientes e da perda da produtividade laboral. Além disso, o sexo feminino foi o mais acometido com 73,37% dos casos;
- O monitoramento da evolução clínica de pacientes positivos para a presença do RNA de CHIKV mostrou que 58,34% evoluíram para a fase crônica da infecção, caracterizada por artralgia nos membros superiores e inferiores.
- Uma paciente idosa sem nenhuma comorbidade anterior à infecção pelo CHIKV teve comprometimento neurológico caracterizado por Polineuropatia Periférica Padrão Axonal Sensitivo-Motora. Esse dado reforça a importância do acompanhamento clínico dos pacientes infectados e a necessidade de uma infraestrutura apta a identificar casos mais graves;

- Dois protocolos de RT-PCR foram padronizados para a detecção de MAYV com base nos genes *nsP1* e *E3/E2*;
- Um novo protocolo de RT-PCR foi desenvolvido e otimizado para detecção do MAYV baseado no gene *E1*. Contudo, na investigação de MAYV em amostras clínicas sugestivas da infecção utilizando este protocolo e os demais protocolos padronizados, nenhum caso foi confirmado. Entretanto, análises posteriores são necessárias para dar continuidade à investigação de uma possível circulação silenciosa deste arbovírus no Estado.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F. et al. Mayaro Virus Infection in Amazonia: A Multimodel Inference Approach to Risk Factor Assessment. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 6, n. 10, 2012.
- ACOSTA-AMPUDIA, Y. et al. Mayaro: an emerging viral threat? **Emerging Microbes & Infections**, 2018.
- ALBUQUERQUE, I. G. et al. Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 128-129, 2012.
- ALVA-URCIA, C. Emerging and reemerging arboviruses: A new threat in Eastern Peru. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, 2017.
- AN, W. et al. Recent progress on chikungunya vírus research. **Virologica Sinica**, v. 32, n. 6, 2017.
- ARANKALLE, V. A. et al. Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963-2006) with special reference to the 2005–2006 explosive epidemic. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 7, p. 1967-1976, 2007.
- ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; CRUZ-OLIVEIRA, C.; DA POIAN, A. T. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of alphavirus-induced arthritis. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-11, 2013.
- ATKINS, G. F. The pathogenesis of Alphavirus. **ISRN Virology**, 2013.
- AUGUSTE, Albert J. et al. Evolutionary and ecological characterization of Mayaro virus strains isolated during an outbreak, Venezuela, 2010. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1742-1750, 2015.
- AZEVEDO, R. S. S. et al. Mayaro fever virus, Brazilian amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 11, p. 1830, 2009.
- BANDEIRA, A. C. et al. Neonatal encephalitis due to Chikungunya vertical transmission: first report in Brazil. **IDCases**, v. 5, p. 57-59, 2016a.
- BARROS, E. L. T. Caracterização molecular de *Chikungunya virus* e investigação dos arbovírus *Dengue virus* e *Mayaro virus* no estado do Piauí. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2018.
- BORGHERINI, G. et al. Outbreak of chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 11, p. 1401-1407, 2007.
- BORGHERINI, G. et al. Persistent arthralgia associated with Chikungunya virus: A study of 88 adults patients on Reunion Island. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, 2008.
- BRAGA, J. U. et al. Accuracy of Zika virus disease case definition during simultaneous Dengue and Chikungunya epidemics. **PLOS One**, v. 12, n. 6, 2017.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 48, 2015. Brasília (DF): Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49, 2016. Brasília (DF): Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 50, 2017. Brasília (DF): Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 10, 2018. Brasília (DF): Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, 2018.

BRONZONI, R.V.D.M. et al. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 2, p. 696-702, 2005.

BROOKS, G. F. et al. Microbiologia de Jawetz, Melnick e Adelberg. 26. Ed. Porto Alegre: AMGH, 2014

BRUNINI, S et al. High frequency of Mayaro virus IgM among febrile patients, Central Brazil. **Emerg Infect Dis** 23:1025–6, 2017.

BURT, F. J. et al. Chikungunya: a re-emerging virus. **The Lancet**, v. 379, n. 9816, p. 662-671, 2012.

BURT, F. J. et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **Lancet Infectious Diseases**, v. 17, 2017.

CABRAL-CASTRO, M. J. et al. Molecular and serological techniques to detect co-circulation of DENV, ZIKV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients. **Journal of Clinical Virology**, v. 82, p. 108–111, 2016.

CAGLIOTI, C. et al. Chikungunya virus infection: an overview. **New Microb**, 36, 211-227, 2013.

CALISHER, C. H. et al. Isolation of *Mayaro virus* from a migrating bird captured in Louisiana in 1967. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 8, n. 3, p. 243-248, 1974.

CARDOSO, C.W. et al. Outbreak of exanthematous illness associated with Zika, Chikungunya, and Dengue viruses, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 12, 2015.

CARDOSO, C.W. et al. Unrecognized Emergence of Chikungunya Virus during a Zika Virus Outbreak in Salvador, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 11, n. 1, 2017.

CARDOSO, F. D. Circulação do *Chikungunya virus* genótipo ECSA durante a epidemia de 2016 no Brasil. Universidade Federal do Piauí. Parnaíba, 2017.

CARRERA, J-P. et al. Unusual pattern of Chikungunya virus epidemics in the Americas, the Panamanian experience. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, 2017.

CARRILO-HERNÁNDEZ, M. Y. et al. Co-circulation and simultaneous coinfection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. **BMC Infectious Diseases**, 2018.

- CASSEB, A. R. et al. Arbovírus: importante zoonose na Amazônia Brasileira. **Revista Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 391-403, 2013.
- CASTRO, J. A. F.; et al. Dengue Viruses Activity in Piauí, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 1021-1023, 2003.
- CAUCHEMEZ, S. et al., Local and regional spread of Chikungunya fever in the Americas. **Euro Surveillance**, v. 19, n. 28, p. 20854, 2014.
- CHENG, R. H. et al. Nucleocapsid and glycoprotein organization in an enveloped virus. **Cell**, v. 80, n. 4, p. 621-630, 1995.
- CLETON, N. B. et al. Syndromic Approach to Arboviral Diagnostics for Global Travelers as a Basis for Infectious Disease Surveillance. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, 2015.
- COFFEY, L. L. et al. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 155-176, 2013.
- COFFEY, L. L.; FAILLOUX, A. B.; WEAVER, S. C. Chikungunya virus–vector interactions. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4628-4663, 2014.
- COIMBRA, T. L. M. Mayaro virus: imported cases of human infection in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 4, p. 221-224, 2007.
- COUDERC, T.; LECUIT, M. Chikungunya vírus pathogenesis: from bedside to bench. **Antiviral Research**, v. 121, 2015.
- COLLUCCI, C. Brazilian health authorities on alert after rise in deaths from chikungunya. **BMJ**, v. 355, p. i6360, 2016.
- COSTA, A. C. et al. Spread of Chikungunya Virus East/Central/South African Genotype in Northeast Brazil. **Emerging Infectious Disease**, v. 23, n. 10, p. 1472-1474, 2017.
- COSTA, V. G. et al. Silent emergence of Mayaro and Oropouche viruses in humans in Central Brazil. Letters to Editor/ **Int Jou Inf Dis**, v. 62, p. 84–85, 2017.
- COUDERC, T.; LECUIT, M. Chikungunya virus pathogenesis: from bedside to bench. **Antiviral Research**, v. 121, 2015.
- CUNHA, M. S. et al. Autochthonous Transmission of East/Central/South African Genotype Chikungunya Virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 10, p. 1737, 2017.
- DIEFFENBACH, C. W.; LOWE, T. M. J.; DVEKSLER G. S. General concepts for PCR primer design. **PCR Methods and applications**. 1993.
- DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; VON ZUBEN, A. P. B. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 0, p. 10–15, 2017.
- DUPUIS-MAGUIRAGA, L. et al. Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 6, n. 3, p. e1446, 2012.

- ECONOMOPOULOU, A. et al. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005–2006 outbreak on Réunion. **Epidemiology and Infection**, v.137, p. 534–41, 2009.
- EDWARDS, C. J. et al. Molecular diagnosis and analysis of Chikungunya virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 39, n. 4, 2007.
- EPELBOIN, L. et al. Fatal case of chikungunya and concomitant thrombotic thrombocytopenic purpura in French Guiana during air flight medical evacuation. **Journal of Travel Medicine**, 2017.
- ESPOSITO, D. L.; FONSECA, B. A. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? **Braz J Infect Dis**. 2017.
- FARES, R. C. G.; et al. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-14, 2015.
- FARIA, N. R. et al. Epidemiology of Chikungunya virus in Bahia, Brazil, 2014-2015. **PLOS Currents Outbreaks**, v. 1, p. 2016.
- FIGUEIREDO, M. L. G.; FIGUEIREDO, L. T. M. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 677-683, 2014.
- FOX, J. M.; DIAMOND, M. S. Immune-Mediated Protection and Pathogenesis of Chikungunya Virus. **The Journal of Immunology**, 2016.
- FURUYA-KANAMORI, L. et al. Co-distribution and co-infection of chikungunya and dengue viruses. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 84, p. 1-11, 2016.
- GALÁN-HUERTA, K. A et al. Molecular and Clinical Characterization of Chikungunya Virus Infections in Southeast Mexico. **Viruses**, v. 10, 2018.
- GANESAN, V. K.; DUAN, B.; REID, S. P. Chikungunya virus: pathophysiology, mechanism and modeling. **Viruses**, v. 9, 2017.
- GARCÊS, T. C. C. C. Caracterização molecular de Dengue vírus circulantes e investigação de Flavivírus emergentes no Estado do Piauí. 93f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2016.
- GAROFF, H.; SJÖBERG, M.; CHENG, R. H. Budding of alphaviruses. **Virus Research**, v. 106, n. 2, p. 103-116, 2004.
- GASQUE, P. et al. Chikungunya virus pathogenesis and immunity. **Vector borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 4, p. 241–9, 2015.
- GENDEREN, F. T. et al. First Chikungunya Outbreak in Suriname; Clinical and Epidemiological Features. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, 2016.
- GÉRARDIN, P. et al. Multidisciplinary Prospective Study of Mother-to-Child Chikungunya Virus Infections on the Island of La Réunion. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 3, 2008a.

GÉRARDIN, P. et al. Perceived morbidity and community burden after a Chikungunya outbreak: the TELECHIK survey, a population-based cohort study. **BMC Medicine**, v. 9, n. 1, 2011.

GOULD, E. A. et al. Understanding the alphaviruses: recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. **Antiviral Research**, v. 87, n. 2, p. 111-124, 2010.

GOULD, E. et al. Emerging arboviruses: Why today? **One Health** 4, 1–13, 2017.

GREEN, S. J.; VENKATRAMANAN, R.; NAQIB, A. Deconstructing the Polymerase Chain Reaction: Understanding and Correcting Bias Associated with Primer Degeneracies and Primer-Template Mismatches. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, 2015.

GUZMAN, M. et al.; Dengue infection. **Nature Review**. v. 2, 2016

HALSEY, E.S. et al. *Mayaro virus* infection, Amazon Basin region, Peru, 2010-2013. **Emerging Infectious Disease**, v. 19, n. 18, p. 39-42, 2013.

HIGGS, S; VANLANDINGHAM, D. Chikungunya virus and its mosquito vectors. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 4, p. 231-240, 2015.

HOTEZ, P.J.; MURRAY, K. O. Dengue, West Nile virus, chikungunya, Zika- and now Mayaro? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2017.

HOYOS-LOPEZ, Richard et al. Molecular identification of Saint Louis encephalitis virus genotype IV in Colombia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 6, p. 719-725, Sept. 2015.

HUITS, R. et al. Chikungunya virus infection in Aruba: Diagnosis, clinical features and predictors of post-chikungunya chronic polyarthralgia. **PLOS One**, v. 13, n. 4, 2018.

JAVELLE, E. et al. Specific Management of Post-Chikungunya Rheumatic Disorders: A Retrospective Study of 159 Cases in Reunion Island from 2006-2012. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, 2015.

JOHNSON, B. W. et al. Evaluation of Commercially Available Chikungunya Virus Immunoglobulin M Detection Assays. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 95(1), pp. 182–192, 2016.

JOSSERAN, L. et al. Chikungunya disease outbreak, Reunion island. **Emerging Infectious Disease**, v. 12, n. 12, p. 1994-1995, 2006.

JUNT, T. et al. Determination of natural versus laboratory human infection with Mayaro virus by molecular analysis. **Epidemiology & Infection**, v. 123, 1999.

KAM, Y. W. et al. Immuno-biology of Chikungunya and implications for disease intervention. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 14–15, p. 1186–1196, 2009.

KASHYAP, R. S. et al. Diagnosis of Chikungunya Fever in an Indian Population by an Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Protocol Based on an Antigen Detection Assay: a Prospective Cohort Study. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.17, n. 2, p. 291–297, 2010.

KEE, A. C. L.; YANG, S.; TAMBYAH, P. Atypical Chikungunya virus infections in immunocompromised patients. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, 2010.

- KOSASIH, H. et al. Evidence for endemic Chikungunya virus infections in Bandung, Indonesia. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 7, n. 10, p. e2483, 2013.
- KUMAR, C. V. M. N.; JOHNSON, A. M. A.; GOPAL, D. V. R. S. Molecular characterization of chikungunya virus from Andhra Pradesh, India and phylogenetic relationship with Central African isolates. **Indian Journal of Medical Research**, v.126, p. 534-40, 2007.
- KUMAR, V. et al. Chikungunya Fever Presenting as Life Threatening Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. **Journal of The Association of Physicians of India**, v. 65, 2017.
- LANGSJOEN, R. M. et al. Molecular Virologic and Clinical Characteristics of a Chikungunya Fever Outbreak in La Romana, Dominican Republic, 2014. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, 2016.
- LARAS, K. et al. Tracking the re-emergence of epidemic Chikungunya virus in Indonesia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, 2005.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, 2007.
- LEDNICKY, J. et al. *Mayaro Virus* in Child with Acute Febrile Illness, Haiti, 2015. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 10, n. 4, 2016.
- LEMANT, J. et al. Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the reunion island outbreak in 2005–2006, **Critical Care Medicine**, v. 36, n. 9, p. 2536-2541, 2008.
- LEPARC-GOFFART, Isabelle et al. Chikungunya in the Americas. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 514, 2014.
- LEUNG, J. Y. S.; NG, M. M. L.; CHU, J. J. H. Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells. **Advances in Virology**, v. 2011, p. 1-9, 2011.
- LIANG, G.; GAO, X.; GOULD, E. A. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. **Emerging Microbes & Infections**, v. 4, n. 3, p. e18, 2015.
- LIMA-CÂMARA, T. N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, n. 36, 2016.
- LLAGONNE-BARETS, M. et al. A case of Mayaro virus infection imported from French Guiana. *Journal of Clinical Virology* 77, 66–68, 2016.
- LO PRESTI, A. et al. Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: a review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 12, p. 925-932, 2014.
- LORENZ, C. et al. Impacto of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, 2017.
- LONG, K. C. et al. Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 85, p. 750–757, 2011.
- LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.



- LUM, F. M.; NG, L. F. P. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. **Antiviral Research**, v. 120, n. June, p. 165–174, 2015.
- LUMSDEN, W. H. R. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953 II. General description and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 33-57, 1955.
- MACKAY, I. M. E.; ARDEN, K. E. *Mayaro virus*: a forest virus primed for a trip to the city? **Microbes and Infection**, v. 18, n. 1, p. 724-734, 2016.
- MAGALHÃES, T. et al. Zika virus displacement by a Chikungunya outbreak in Recife, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, 2017.
- MARDEKIAN, S. K.; ROBERTS, A. L. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. **BioMed Research International**, v. 2015, n. 1, p. 1-8, 2015.
- 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**, v. 57, S2, p. 421-437, 2017.
- MATIOLI, S. R. (Ed.). *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos, Editora, 2004.
- MATTAR, S. et al. Outbreak of Chikungunya virus in the north Caribbean area of Colombia: clinical presentation and phylogenetic analysis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 10, 2015.
- MAVIAN, C. et al. Emergence of recombinant *Mayaro virus* strains from the Amazon basin. **Scientific Reports**, 2017.
- MEHTA, R. et al. The neurological complications of Chikungunya virus: a systematic review. **Reviews in Medical Virology**, v. 28, 2018.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação Epidemiológica do Mayaro. 2016. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-a-z/febre-do-mayaro/20950-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em 03 de abril de 2018.
- MOHAN, A. et al. Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of Chikungunya fever: lessons learned from the re-emerging epidemic. **Indian Journal of Dermatology**, v. 55, n. 1, p. 54-63, 2010.
- MORRISON, T. E. Reemergence of Chikungunya virus. **Journal of Virology**, v. 88, n. 20, 2014.
- MOTA, M. T. O. et al. Mayaro virus: a neglected arbovirus of the America. **Future Virology**, 2015.
- MOTA, M. T. O. et al. Mosquito-transmitted viruses the great Brazilian challenge. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 171, p. 1-13, 2016.
- MOURÃO, M. P. G. et al. Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007-2008. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12 n. 1, p. 42-46, 2012.
- MOURÃO, M. P. G. et al. Arboviral diseases in the Western Brazilian Amazon: a perspective and analysis from a tertiary health & research center in Manaus, State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 20-26, 2015.

- MUKHOPADHYAY, S. et al. Mapping the structure and function of the E1 and E2 glycoproteins in alphaviruses. **Structure**, v. 14, n. 1, p. 63-73, 2006.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia Médica*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
- MURUGAN, S.B.; SATHISHKUMAR, R. Chikungunya infection: A potential re-emerging global threat. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 10, 2016.
- MUSSO, D. & GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, p. 487–524, 2016.
- NAVECA, F. G. et al. Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and Oropouche-like viruses. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 7, 2017.
- NICHOL, S. T.; ARIKAWA, J.; KAWAOKA, Y. Emerging viral diseases. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 97, n. 23, 2000.
- NKOGHE, D. et al. Clinical forms of Chikungunya in Gabon, 2010. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, 2012.
- NSOESIE, E. O. et al. Global distribution and environmental suitability for Chikungunya virus, 1952 to 2015. **Euro surveillance**, v. 21, n. 20, p.1-22, 2016.
- NUNES, A. R. D. et al. Improved reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the detection of flaviviruses with semi-nested primers for discrimination between dengue virus serotypes and Zika virus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 5, 2018.
- NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1, 2015.
- OKABAYASHI, T. et al. Detection of Chikungunya Virus Antigen by a Novel Rapid Immunochromatographic Test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 2, 2015.
- OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. C. Microcephaly and Zika virus. **J Pediatr (Rio J)**, v. 92, n. 2, 2016.
- OLIVEIRA, R. R. Padronização e comparação de técnicas de reação em cadeia por polimerase (PCR) para detecção do metapneumovírus humano em secreções respiratórias. 83f. Universidade de São Paulo, 2007.
- PARDIGON, N. The biology of Chikungunya: a brief review of what we still do not know. **Pathologie Biologie**, v. 57, n. 2, p. 127-132, 2009.
- PASTORINO, B. et al. Epidemic resurgence of chikungunya virus in democratic Republic of the Congo: identification of a new central African strain. **Journal Medical Virology**, v. 74, p. 277-282, 2004.
- PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Neutralising antibodies for *Mayaro virus* in Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p.125-133, 2015.
- PEELING, R. W. et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 30-37, 2010.
- PETERS, C. M. M. et al. Chikungunya virus outbreak in Sint Maarten: Long-term arthralgia after a 15-month period. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 55, 2018.

PETERSEN, L. R.; POWERS, A. M. Chikungunya: epidemiology [version 1; referees: 2 approved], **F1000 Faculty Reviews**, v. 82, p. 1-8, 2016.

PFEFFER, M. et al. Specific detection of Chikungunya virus using a RT-PCR/nested PCR combination. **Journal of Veterinary Medicine B. Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 49, n. 1, 2002.

PORTER, K. R. et al. A serological study of *Chikungunya Virus* transmission in Yogyakarta, Indonesia: evidence for the first outbreak since 1982. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 35, n. 2, p. 408-415, 2004.

POWERS, A. M. et al. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. **Journal of Virology**, v. 75, n. 21, p. 10118-10131, 2001.

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

POWERS, A. M. et al. Genetic relationships among *Mayaro* and *Una* Viruses suggest distinct patterns of transmission. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 3, p. 461-469, 2006.

POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of Chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 9, p. 2363-2377, 2007.

PULMANAUSAHAKUL, R. et al. Chikungunya in Southeast Asia: understanding the emergence and finding solutions. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 10, p. e671–e676, 2011.

QUEYRIAUX, B. et al. Clinical burden of *Chikungunya virus* infection. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 2-3, 2008.

RABENAU, H. F. et al. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. **Journal of Clinical Virology**, v. 40, 2007.

RAJAPAKSE, S.; RODRIGO, C.; RAJAPAKSE, A. Atypical manifestations of Chikungunya infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 2, p. 89-96, 2010.

RECEVEUR, M. C. et al. Infection with Mayaro virus in a French traveller returning from the Amazon region, Brazil, January, 2010. **Euro Surveillance**, v. 15, n. 18, 2010

REMENYI, R. et al. Persistent replication of a Chikungunya virus replicon in human cells is associated with stables cytoplasmic granules containing Non-structural protein 3. **Journal of Virology**, v. 92, n. 16, 2018.

REZZA, G. et al. Infection with Chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. **Lancet**, v. 370, n. 9602, p. 1840–1846, 2007.

ROBINSON, M. C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 28-32, 1955.

- RODRÍGUEZ-MORALES, A. J. et al. Mayaro, Oropouche and Venezuelan Equine Encephalitis viruses: Following in the footsteps of Zika? Correspondence **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 15, p. 72-73, 2017.
- ROTH, A. et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections – an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. **Euro Surveillance**, v. 19, n. 41, 2014.
- RUPP, J. C. et al. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 9, p. 2483-2500, 2015.
- RYMAN, K. D.; KLIMSTRA, W. B. Host responses to alphavirus infection. **Immunological Reviews**, v. 225, n. 1, p. 27–45, 2008.
- SACRAMENTO, C. Q. et al. The clinically approved antiviral drug Sofosbuvir inhibits Zika virus replication. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.
- SAHADEO, N. et al. Molecular Characterisation of Chikungunya Virus Infections in Trinidad and Comparison of Clinical and Laboratory Features with Dengue and Other Acute Febrile Cases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 11, 2015.
- SAM, I. C. et al. Updates on chikungunya epidemiology, clinical disease, and diagnostics. **Vector Borne Zoonotic Disease**. v.15, n. 4, p. 223-30, 2015.
- SANTOS, L. S. Vigilância epidemiológica e análise molecular do *Dengue vírus* no Piauí: busca de sorotipos circulantes. 79f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2013.
- SCHILTE, C. et al. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 7, n. 3, p. e2137, 2013.
- SCHUFFENECKER, I. et al. Genome microevolution of Chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. **PLOS Medicine**, v. 3, n. 7, p. e263, 2006.
- SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 491–500, 2010.
- SERGON, K. et al. Seroprevalence of *Chikungunya virus* infection on Grande Comore Island, union of the Comoros, 2005. **The American journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 6, p. 1189-1193, 2007.
- SERGON, K. et al. Seroprevalence of *Chikungunya virus* (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 2, p. 333-337, 2008.
- SERRA, O. P. et al. *Mayaro virus* and *Dengue virus* 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 111, n. 1, p. 20-29, 2016.
- SESAPI. Boletim Epidemiológico Semanal - Edição Especial: Arboviroses e Síndromes Neurológicas no Piauí. Diretoria de Unidade de Vigilância e Atenção à Saúde/SESAPI, 2016.
- SESAPI. Dengue, Chikungunya, Zika e Microcefalia: Boletim da 52ª semana epidemiológica – 2017. Diretoria de Unidade de Vigilância e Atenção à Saúde/SESAPI, 2017.

- SHARP, T. M. et al. Surveillance for Chikungunya and Dengue During the First Year of Chikungunya Virus Circulation in Puerto Rico. **Journal of Infectious Diseases**, 2016.
- SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3.
- SILVA JÚNIOR, J. V. J. et al. Current status, challenges and perspectives in the development of vaccines against yellow fever, dengue, Zika and chikungunya viruses. **Acta Tropica**, 2018.
- SILVA, V. P. et al. Peripheral polyneuropathy associated with Chikungunya virus infection. **Journal of NeuroVirology**, 2019.
- SIMIONATTO, S. et al. Um protocolo de “nested-PCR” para detecção do vírus da anemia das galinhas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 2, 2005.
- SINGH, S. K.; UNNI, S. K. Chikungunya virus: host pathogen interaction. **Revista Medical Virology**, v. 21, p. 78–88, 2011.
- SISSOKO, D. et al. Seroprevalence and risk factors of chikungunya virus infection in Mayotte, Indian Ocean, 2005-2006: a population-based survey. **PLoS One**, v. 3, n. 8, p. e3066, 2008.
- SISSOKO, D. et al. Post-Epidemic Chikungunya Disease on Reunion Island: Course of Rheumatic Manifestations and Associated Factors over a 15-Month Period. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 3, 2009.
- SOLIGNAT, M. et al. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 393, n. 2, p. 183-197, 2009.
- SOLOMON, T.; BAYLIS, M.; BROWN, D. Zika virus and neurological disease—approaches to the unknown. **Lancet Infect Dis** 16, 402–404, 2016.
- SOUMAHORO, M-K. et al. Impact of Chikungunya virus infection on health status and quality of life: a retrospective cohort study. **PLoS ONE**, v. 4, n 11, p. e7800, 2009.
- SOUMAHORO, M-K. et al. The Chikungunya Epidemic on La Réunion Island in 2005–2006: A Cost-of-Illness Study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 6, 2011.
- SOUZA, T. et al. First Report of the East-Central South African genotype of Chikungunya virus in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS Currents Outbreaks**, v. 9, ed. 1, 2017.
- SOUZA, T. et al. Following in the Footsteps of the Chikungunya Virus in Brazil: The First Autochthonous Cases in Amapá in 2014 and Its Emergence in Rio de Janeiro during 2016. **Viruses**, v. 10, 2018.
- SPUUL, P. et al. Assembly of Alphavirus Replication Complexes from RNA and Protein Components in a Novel *trans*-Replication System in Mammalian Cells. **Journal of Virology**, v. 85, n. 10, 2011.
- STAIKOWSKY, F. et al. Prospective study of Chikungunya virus acute infection in the Island of La Reunion during the 2005–2006 outbreak. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, p. e7603, 2009.

STAPLES, J. E.; BREIMAN, R. F.; POWERS, A. M. Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 6, p. 942-948, 2009.

STAPLES, J. E.; FISCHER, M. Chikungunya Virus in the Americas – What a Vectorborne Pathogen Can Do. **The New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 10, 2014.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 491–562, 1994.

SUBUDHI, B. B. et al. Current strategies for inhibition of Chikungunya infection. **Viruses**, v. 10, n. 5, 2018.

SUHRBIER, A.; JAFFAR-BANDJEE, M. C.; GASQUE, P. Arthritogenic Alphaviruses an overview. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 7, p. 420-429, 2012.

TALARMIN, A. et al. *Mayaro virus* fever in French Guiana: isolation, identification and seroprevalence. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. v. 59, p. 452-456, 1998.

TANABE, I. S. B. et al. Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, 2018.

TEIXEIRA, M. G. et al. East/Central/South african genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. **Emerging Infectious Disease**, v. 21, n. 5, p. 906-8, 2015.

TERZIAN, A. C. et al. Isolation and characterization of *Mayaro virus* from a human in Acre, Brazil. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. v. 92, p. 401-404. 2015.

THIBERVILLE, S. D. et al. Chikungunya Fever: A Clinical and Virological Investigation of Outpatients on Reunion Island, South-West Indian Ocean. **PLoS Negl Trop Dis** 7(1): e2004, 2013a.

THIBERVILLE, S. D. et al. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Research**, v. 99, n. 3, p. 345-370, 2013b.

TORRES, J. R. Chikungunya fever: Atypical and lethal cases in the Western hemisphere. A Venezuelan experience. **IDCases**, v. 2, p. 6-10, 2015.

TSETSARKIN, K. A. et al. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLOS Pathogens**, v. 3, n. 12, p. e201, 2007.

VALE, V. S. Caracterização molecular de *Dengue virus* circulantes no Nordeste brasileiro. 61f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2015.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. Epidemiologia das encefalites por arbovírus na Amazônia Brasileira. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.33, n. 6, p. 465-476, 1991.

VASCONCELOS, P. F. C.; CALISHER, C. H. Emergence of Human Arboviral Diseases in the Americas, 2000–2016. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**. v. 00, n. 00, 2016.

VERA, C. M. B.; SEGOVIA, F. M. C.; TORRES, L. P. M. Estandarización de uma técnica de RT-PCR anidada para detección de alfavirus. **Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud**, v. 15, n. 2, 2017.

VIEIRA, M. A. C. S. et al. Case Report: West Nile Virus Encephalitis: The First Human Case Reported in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 8, n. 5, p. 377-379, 2015.

VOLK, S. M. et al. Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. **Journal of Virology**, v. 84, n. 13, p. 6497-6504, 2010.

WAGGONER, J. J. Clinical evaluation of a single-reaction real-time RT-PCR for pan-dengue and chikungunya virus detection. **Journal of Clinical Virology**, 2016.

WEAVER, S. C. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 8, p. 360-363, 2013.

WEAVER, S. C. Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 8, n. 6, p. e2921, 2014.

WEAVER, S. C. et al. Alphaviruses: population genetics and determinants of emergence. **Antiviral Research**, v. 94, n. 3, p. 242-257, 2012.

WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 13, p. 1231-1239, 2015.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, n. 2, p. 328-345, 2010.

WEAVER, S. C. et al. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. **Annual Review of Medicine**, v. 69, p. 395-408, 2018.

WONG, K. Z.; CHU, J. J. H. The interplay of Viral and Host factors in Chikungunya virus infection: Targets for Antiviral strategies. **Viruses**, v. 10, n. 6, 2018.

YACTAYO, S. et al. Epidemiology of Chikungunya in the Americas. **The Journal of Infectious Diseases**, 2016.

YOON, I-K. et al. High rate of subclinical Chikungunya virus infection and association of neutralizing antibody with protection in a prospective cohort in the Philippines. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 9, n. 5, 2015.

ZELLER, H.; BORTEL, W. V.; SUDRE, B. Chikungunya: Its history in Africa and Asia and its spread to new regions in 2013-2014. **The Journal of Infectious Diseases**, 2016.

ZUCHI, N., et al. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6. p. 820-823, 2014.

ZUCKERMAN, Arie Jeremy et al (Ed.). Principles and Practice of Clinical Virology. 5. ed. Chichester: **John Wiley & Sons Ltd**, 2004.

## ANEXO I

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**TÍTULO DA PESQUISA:** “Identificação molecular de *Dengue virus* e outros arbovírus e prevalência de polimorfismos genéticos em pacientes do Piauí”.

**PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:**

Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira e Prof. Dra. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira  
Universidade Federal do Piauí – *Campus* Ministro Reis Velloso, Av. São Sebastião, nº 2819, Bairro Reis Velloso, CEP 64204-035, Parnaíba, Piauí, Brasil. Telefone para contato (inclusive a cobrar): (86) 99920-3470 / (86) 99401-3035

**ESCLARECIMENTOS:**

Prezado colaborador(a), você está sendo convidado(a) a participar como **VOLUNTÁRIO** desta pesquisa, que irá contribuir para o conhecimento dos arbovírus circulantes no estado do Piauí, bem como fatores do paciente (hospedeiro) que podem predispor a infecções pelos arbovírus. O paciente pode ser incluído na pesquisa se apresentar sintomatologia sugestiva de dengue/outras arboviroses, e caso ocorra a realização de exames em instituição pública de saúde de Parnaíba. Caso você concorde com a participação (ou participação da criança), uma pequena quantidade de sangue será obtida, por punção venosa, e transportada imediatamente para o laboratório. O paciente será atendido no serviço de saúde, mesmo que não concorde com a inclusão no estudo ou desista de participar a qualquer momento. Todos os resultados de exames que estiverem prontos estarão a sua disposição a qualquer momento da pesquisa. Você ou a criança não receberão qualquer remuneração pela participação.

Você poderá sentir desconforto durante a coleta de sangue, mas os técnicos disponíveis para o procedimento são bem treinados e credenciados, além de utilizarem todo o material devidamente estéril que forneça segurança ao processo. Qualquer dúvida ou constrangimento que você tiver será esclarecido pelo pesquisador.

Os resultados desta pesquisa serão úteis para avaliarmos os sorotipos/genótipos virais circulantes na cidade de Parnaíba e estado do Piauí, e quais condições relacionadas ao hospedeiro diante da Dengue que são encontradas na população do Piauí. Por se tratar de um estudo populacional, não há benefício direto para o participante. Somente no final do estudo poderemos concluir a participação de alguns fatores genéticos como causadores de uma maior gravidade da infecção. Você terá a garantia de receber esclarecimentos sobre qualquer dúvida relativa aos procedimentos, riscos, benefícios e outras situações relacionadas com a pesquisa. Além disso, você também terá a liberdade de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, e sua decisão não acarretará em qualquer prejuízo na continuidade do seu atendimento e tratamento no serviço de saúde. Se concordar em participar do estudo, suas informações pessoais (nome, endereço, telefone, dentre outras) serão mantidas em sigilo absoluto. A menos que requerido por lei ou por sua solicitação, somente o pesquisador, a equipe da pesquisa e os representantes do Comitê de Ética terão acesso a suas informações pessoais.

### CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA

Eu, \_\_\_\_\_, portador(a) da cédula de identidade/CPF de número \_\_\_\_\_, abaixo assinado, declaro que concordo em participar da pesquisa/estudo “Identificação molecular de *Dengue virus* e outros arbovírus e prevalência de polimorfismos genéticos em pacientes do Piauí”, como VOLUNTÁRIO. Fui suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo a pesquisa. Eu discuti com o Dr. Gustavo Portela Ferreira / Dra. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira ou qualquer um dos demais membros da equipe de pesquisadores sobre minha decisão em participar desta pesquisa. Ficaram claros para mim quais são os propósitos da pesquisa, os procedimentos a serem realizados, seus possíveis desconfortos e riscos, e as garantias de sigilo e



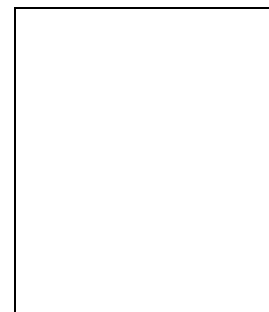
de esclarecimentos. Também ficou claro que minha participação é isenta de despesas. Concordo VOLUNTARIAMENTE em participar da pesquisa e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento / tratamento neste serviço de saúde.

E por estar de acordo, assino o presente termo.

Parnaíba, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ .

\_\_\_\_\_

Assinatura do sujeito participante ou responsável legal



Impressão Digital

.....

**Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.**

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

RG/CPF: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

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

RG/CPF: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

.....

**Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.**

Parnaíba, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ .

\_\_\_\_\_

Gustavo Portela Ferreira

\_\_\_\_\_

Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira

**OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:**

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética desta pesquisa, entre em contato com;

Comitê de Ética em Pesquisa – UFPI – *Campus* Ministro Reis Velloso

Endereço: Avenida São Sebastião, 2819 – Bloco 16 – Sala 05 – Bairro Reis Velloso

CEP: 64202-020 – Parnaíba-PI, Fone: (86) 3323-5251

E-mail: cep.ufpi.cmr@gmail.com

**ANEXO II**  
**FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS**

PACIENTE/AMOSTRA N° \_\_\_\_\_ N° CARTÃO DO SUS: \_\_\_\_\_

AMOSTRAS COLETADAS: \_\_\_\_\_

DATA DO ATENDIMENTO: \_\_\_\_\_ LOCAL DE ATENDIMENTO: \_\_\_\_\_

NOME: \_\_\_\_\_ TEL: \_\_\_\_\_

SEXO:  Masculino  Feminino DATA DE NASCIMENTO: \_\_\_\_\_

NOME DA MÃE: \_\_\_\_\_

ENDEREÇO: \_\_\_\_\_

NÚMERO: \_\_\_\_\_ BAIRRO: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

MUNICÍPIO: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_

Adulto  Criança (até 12 anos)  Idoso (acima de 60 anos) Gestante:  1° T  2° T  3° T

Início dos sintomas: \_\_\_\_\_ dias.  Febre: há \_\_\_\_\_ dias.

**SINAIS E SINTOMAS PRESENTES:**

- Cefaleia  Artralgia  Náuseas  Dor retroorbitaria  Mialgia  Icterícia  
 Prostração  Diarreia  Vômitos Exantema:  h prurido  h prurido  
 Manifestações hemorrágicas: gengivorragia - epistaxe - metrorragia - hematêmese - melena - hematúria - petéquias - equimoses.  
 Dor abdominal  Oro persistente/irritabilidade  
 Outros: \_\_\_\_\_

**COMORBIDADES/ DOENÇAS CRÔNICAS COEXISTENTES:**

- Hipertensão Arterial  Doença Hematológica \_\_\_\_\_  
 Diabetes Mellitus  Doença Cardiovascular \_\_\_\_\_  
 DPOC  Doença Autoimune  Insuficiência Renal  Doença ácido-péptica  Hepatopatia  
 Anemia Falciforme  
 Outras: \_\_\_\_\_  
 Não há comorbidades/doenças crônicas coexistentes.

**AVALIAÇÃO QUANTO À PRESENÇA DE SINAIS DE CHOQUE/HEMORRAGIA GRAVE:**

- Comprometimento respiratório  Hemorragia grave com ou sem sinais de choque  
**Hemorragia presente**  Não  Sim. Qual (is)?  
 Conjuntival  Epistaxe  Gengivorragia  Petéquias  Equimose  
 Metrorragia  Hematúria  Hematêmese  Melena  Hemoptóicos

**SINAIS DE CHOQUE:**

- Pulso rápido e fino  Extremidades frias  Pele pálida e úmida  Enchimento capilar lento (> 2 seg.)  
 Pressão arterial convergente (PA diferencial < 20 mmHg)  Hipotensão postural (queda > 30 mmHg)  
 Não há presença de sinais de choque hipovolêmico/hemorragia grave  
 Outros: \_\_\_\_\_

### ANEXO III

#### QUESTIONÁRIO PARA AVALIAÇÃO DAS MANIFESTAÇÕES CRÔNICAS

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

Idade: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_

Data da coleta: \_\_\_\_\_

Primeiro contato: \_\_\_\_\_ Segundo Contato(Atual): \_\_\_\_\_

Criança ( ) Jovem ( ) Adulto ( ) Idoso ( ) Gestante ( ) \_\_\_\_\_ Puerpério ( )

#### SINTOMAS E DADOS CLÍNICOS DE FASE CRÔNICA

1. Tempo de duração dos sintomas (semanas ou meses): \_\_\_\_\_

2. Rigidez matinal (>30 min): sim ( ) não ( )

3. Sintomas de fase crônica: \_\_\_\_\_

4. Principais membros/sítios anatômicos/articulações acometido(a)s:

Dedos das mãos ( ) Mãos ( ) Punhos ( ) Cotovelos ( ) Ombros ( )

Quadril ( ) Joelhos ( ) Tornozelos ( ) Pés ( ) Dedos dos pés ( )

Dores na coluna ( ) -----> cervical ( ) Torácica ( ) Lombar ( )

4.1 - Outras membros/articulações acometidos \_\_\_\_\_

5. Intensidade da artralgia: Fraca ( ) Moderada ( ) Forte ( )

6. Padrão de acometimento articular: simétrico ( ) assimétrico ( )

7. Presença de edema/inchaço nos membros ou articulações: não ( ) sim ( )

Quais membros? \_\_\_\_\_

7.1 - Edema com vermelhidão: sim ( ) não ( )

7.2 - Edema com calor sobre a articulação: sim ( ) não ( )

8. Dormência nos membros: sim ( ) não ( )

9. Queixas: Permanente ( ) Recidivante ( )

Outros sintomas Clínicos: mialgia ( ) manifestações cutâneas/ coceira/ vermelhidão ( ) falta de concentração ( ) depressão ( ) \_\_\_\_\_

10. Limitação dos movimentos articulares ao realizar atividades cotidianas: sim ( ) não ( )

11. Uso de medicamentos para combater as dores ocasionadas por CHIKV: sim ( ) não ( )

-Quais? \_\_\_\_\_