



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**SHIRLENE TELMOS SILVA DE LIMA**

**ÓBITOS POR CHIKUNGUNYA COM ENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO  
CENTRAL: UM ESTUDO TRANSVERSAL DE CASOS DURANTE A EPIDEMIA DE  
2017 NO CEARÁ, BRASIL**

**FORTALEZA**

**2020**

**SHIRLENE TELMOS SILVA DE LIMA**

**ÓBITOS POR CHIKUNGUNYA COM ENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO  
CENTRAL: UM ESTUDO TRANSVERSAL DE CASOS DURANTE A EPIDEMIA DE  
2017 NO CEARÁ, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Miyajima  
Coorientador: Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti

FORTALEZA

2020

---

L71Ó

Lima, Shirlene Telmos Silva de.

Óbitos por chikungunya com envolvimento do Sistema Nervoso Central : um estudo transversal de casos durante a epidemia de 2017 no Ceará, Brasil / Shirlene Telmos Silva de Lima. – 2020.

87f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2020.

Orientação : Prof. Dr. Fábio Miyajima.

Coorientação : Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti.

1. Vírus Chikungunya 2. SNC. 3. ECSA. 4. Casos Fatais. 5. Arbovírus. I. Título.

CDD 610

---

**SHIRLENE TELMOS SILVA DE LIMA**

**ÓBITOS POR CHIKUNGUNYA COM ENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO  
CENTRAL: UM ESTUDO TRANSVERSAL DE CASOS DURANTE A EPIDEMIA DE  
2017 NO CEARÁ, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Miyajima  
Coorientador: Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Fábio Miyajima (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Izabel Letícia Cavalcante Ramalho  
Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará (LACEN/CE)

---

Dra. Elza Gadelha Lima  
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

---

Dra. Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo  
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

---

Dr. William Marciel de Souza  
Universidade de São Paulo (USP)

Ao meu esposo Paulo Eduardo pelo incentivo,  
apoio incondicional e presença constante em  
minha vida.

Às minhas filhas Maria Eduarda e Maria de  
Fátima, amores de minha vida. Amo vocês.

À minha filha Mariana (*in memoriam*), que  
estará eternamente comigo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da minha vida.

À minha mãe, meu exemplo de vida, minha fortaleza e minha força, que me mostrou o valor dos estudos e guiou-me pelo caminho do bem. Vencemos, minha mãe.

Ao meu irmão José Alexandre Telmos Silva, meu exemplo de irmão e profissional, que me orientou no início de minha jornada, para que eu me tornasse a profissional que sou hoje.

Ao meu esposo Paulo Eduardo Martins de Lima, meu maior incentivador, meu alicerce, meu amigo, meu amor. Obrigada pelo aconchego, pela tolerância, pelo carinho.

Às minhas filhas Maria Eduarda e Maria de Fátima, pela paciência, pela compreensão, pelos abraços e sorrisos, por existirem em minha vida.

A você, minha filha Mariana (*in memoriam*), por tudo que aprendi com sua partida.

Ao Prof. Dr. Fábio Miyajima, pela orientação.

Ao Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti, pela ajuda e sugestões, contribuindo para o enriquecimento desse trabalho.

À Dra. Liana Perdigão Mello, diretora do LACEN-CE, pelo apoio, compreensão, incentivo, motivação e atenção dispensada a mim durante o doutorado.

Às Dras. Maria do Carmo Vidal Gadelha Lima e Ana Carolina Barjud, chefes imediatas, pela ajuda e apoio nesse período de minha vida.

À Leda Maria Simões Mello, minha amiga e profissional extremamente dedicada, que me apresentou a Biologia Molecular no dia a dia, que me transmitiu suas experiências com essa ciência e com quem tive o grande prazer de contar durante o desenvolvimento de todas as etapas desse estudo. Não consigo transformar em palavras toda a gratidão que sinto por sua ajuda e carinho.

À Dra. Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo, pela disponibilidade, ensinamentos e por sempre transmitir suas experiências.

Ao Dr. William Marciel de Souza, pela colaboração nas análises genéticas das amostras desse estudo, pelos ensinamentos transmitidos, pelas sugestões e atenção. Obrigada pela confiança e disponibilidade.

Ao Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes, pela atenção, presteza e profissionalismo e, também, por sua contribuição nas análises genéticas das amostras desse estudo.

À Universidade Federal do Ceará, instituição da qual tenho orgulho de ser discente, pela oportunidade de aprendizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas; aos professores, pelos conhecimentos transmitidos e aos funcionários, em especial à Ivone, por sua presteza.

Ao SVO – Serviço de Verificação de Óbito, pelo serviço realizado.

Ao Laboratório Central de Saúde Pública – LACEN/CE, pelo apoio, incentivo e investimento profissional, permitindo o aperfeiçoamento e a capacitação de seus servidores.

Às colegas de profissão Débora Bezerra Silva, Izabel Letícia Cavalcante Ramalho, Jaqueline Souto Vieira Burgoa, Karene Ferreira Cavalcante, Maria Elizabeth Lisboa de Melo, Vânia Angélica Feitosa Viana, pelo incentivo.

À Alexana Amaral, Aline Silva, Berivaldo Freire, Carmélia de Carvalho, Cely Vitor Barbosa, Cláutenes Dantas, Daiana Barroso, Francisneide Dutra (Loura), Julyane Feitosa, Larissa Duarte, Lina Paiva, Luciene Bié, Marília Costa, Suyanne Tavares, companheiros de trabalho, que suavizaram o final dessa árdua jornada, ajudando-me na rotina do serviço, com sorrisos leves e pensamentos positivos. Obrigada pelo compromisso e profissionalismo de sempre.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela contribuição nas análises genéticas dessa pesquisa.

A todos que participaram de forma direta ou indireta nesse trabalho, muito obrigada.

*“Quando tudo tiver parecendo ir contra você,  
lembre-se que o avião decola contra o vento, e  
não a favor dele.”*

(Henry Ford)



## RESUMO

**Introdução:** O vírus Chikungunya (CHIKV) surgiu nas Américas em 2013 e causou aproximadamente 2,1 milhões de casos e mais de 600 mortes.

**Objetivo:** Descrever as características clínicas e epidemiológicas de casos fatais por chikungunya no Ceará em 2017, incluindo óbitos com o envolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC), e realizar o estudo genômico do CHIKV nesses óbitos.

**Métodos:** Soro, líquido cefalorraquidiano (LCR) e amostras de tecido de 100 casos fatais com suspeita de infecção por arbovírus foram testadas para CHIKV, dengue (DENV) e Zika vírus (ZIKV). Relatórios clínicos, epidemiológicos e de óbitos foram obtidos para pacientes com infecção confirmada pelo CHIKV. A análise de regressão logística foi realizada para identificar fatores independentes associados ao risco de morte durante a infecção pelo CHIKV. A análise filogenética foi realizada usando genomas inteiros de um subconjunto de casos.

**Resultados:** 68 casos fatais tiveram infecção pelo CHIKV confirmada por RT-qPCR (52,9%), antígeno viral (41,1%) e / ou IgM específico (63,2%). Codeteção de CHIKV e DENV foi encontrada em 22% dos casos fatais; CHIKV e ZIKV em 2,9% e, CHIKV, DENV e ZIKV em 1,5%. Dentre os pacientes que vieram a óbito por CHIKV, 39 apresentaram sinais e sintomas neurológicos, com detecção do RNA-CHIKV no LCR de 92,3% desses pacientes, o que mostra uma correlação do CHIKV com o SNC. Os resultados fatais foram associados à síndrome irreversível da disfunção de múltiplos órgãos. Pacientes com diabetes parecem morrer com maior frequência durante a fase pós-aguda. Entretanto, CHIKV pode causar mortes mesmo em pacientes sem comorbidades, incluindo adultos jovens. A análise genética mostrou a circulação do genótipo Leste-Centro-Sul Africano do CHIKV (CHIKV-ECSA) no Ceará, e não revelou mutação genômica do vírus associada ao desfecho fatal.

**Conclusão:** Esta investigação transversal de mortes por CHIKV, o maior estudo realizado até o momento, revela a correlação do CHIKV com o SNC e também que as cepas de CHIKV-ECSA podem causar morte em indivíduos de grupos de risco e sem risco, incluindo adultos jovens.

**Palavras-chave:** Vírus Chikungunya. SNC. ECSA. Casos fatais. Arbovírus.

## ABSTRACT

**Background:** *Chikungunya virus* (CHIKV) emerged in the Americas in 2013 and has caused approximately 2.1 million cases and over 600 deaths.

**Objective:** Describe the clinical and epidemiological characteristics of fatal cases due to chikungunya in Ceará in 2017, including deaths with involvement of the Central Nervous System (CNS), and the genomic study of CHIKV in these deaths.

**Methods:** Serum, cerebrospinal fluid (CSF) and tissue samples from 100 fatal cases with suspected arbovirus infection were tested for CHIKV, dengue (DENV) and Zika virus (ZIKV). Clinical, epidemiological and death reports were obtained for patients with confirmed CHIKV infection. Logistic regression analysis was undertaken to identify independent factors associated with risk of death during CHIKV infection. Phylogenetic analysis was conducted using whole genomes from a subset of cases.

**Results:** 68 fatal cases had CHIKV infection confirmed by RT-qPCR (52.9%), viral antigen (41.1%), and/or specific-IgM (63.2%). Co-detection of CHIKV with DENV were found in 22% of fatal cases, ZIKV in 2.9%, and DENV and ZIKV in 1.5%. A total of 39 CHIKV-deaths presented with neurological signs and symptoms, and CHIKV-RNA was found in the CSF of 92.3% of these patients. Fatal outcomes were associated with irreversible multiple organ dysfunction syndrome. Patients with diabetes appear to die at a higher frequency during the sub-acute phase. However, CHIKV can cause deaths even in patients without comorbidities. Young adults can also die from Chikungunya. Genetic analysis showed circulation of two CHIKV-East Central South African (ECSA) lineages in Ceará and revealed no unique virus genomic mutation associated with fatal outcome.

**Conclusion:** The investigation of the largest cross-sectional cohort of CHIKV-deaths to date reveals the correlation of CHIKV with the CNS and also that CHIKV-ECSA strains can cause death in individuals from both risk and non-risk groups, including young adults.

**Keywords:** Chikungunya virus. SNC. ECSA. Fatal cases. Arbovirus.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Emergência e dispersão da epidemia de CHIKV de 2004 a 2019.....	15
Figura 2 - Estrutura do CHIKV e seu genoma. ....	17
Figura 3 - Período de incubação intrínseco e extrínseco. ....	20
Figura 4 - Ciclo replicativo do CHIKV. ....	22
Figura 5 – Genótipos de CHIKV e a origem da linhagem do Oceano Índico.....	23
Figura 6 - Resposta imune ao CHIKV. ....	24
Figura 7 - Fisiopatologia da infecção pelo CHIKV. ....	25
Figura 8 – Tropismo do CHIKV em humanos. ....	27
Figura 9 –Espectro clínico da chikungunya. ....	28
Figura 10 - Diferentes métodos de diagnóstico da infecção por CHIKV.....	32
Figura 11 - Distribuição de casos confirmados de dengue, chikungunya e zika, por Semana Epidemiológica SE, Ceará, 2016 e 2017. ....	35
Figura 12 - Fluxograma e desenho do estudo.....	45
Figura 13 – Óbitos por chikungunya descritos neste estudo. ....	46
Figura 14 – Notificação de casos de chikungunya. ....	47
Figura 15 - Informações epidemiológicas, sinais/sintomas e comorbidades dos 68 casos fatais por CHIKV no Ceará, Brasil. ...	49
Figura 16 - Árvore filogenética do genótipo CHIKV-ECSA no Brasil (n = 71), incluindo 6 novas sequências do Ceará.....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - CHIKV: proteínas e suas funções.....	18
Tabela 2 - Manifestações típicas e atípicas da doença chikungunya em pacientes. ....	30
Tabela 3 - Oligonucleotídeos específicos utilizados para a RT-qPCR de DENV, CHIKV e ZIKV. ....	40
Tabela 4 - Análise de regressão logística univariada e multivariada de fatalidades na fase subaguda por infecção por CHIKV.....	49
Tabela 5 - Demografia e comorbidades dos casos fatais de CHIKV (n = 68). ....	50

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1</b>	<b>Histórico</b> .....	<b>14</b>
<b>1.2</b>	<b>Classificação, genoma e estrutura do CHIKV</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3</b>	<b>Ciclo de transmissão do CHIKV</b> .....	<b>19</b>
<b>1.4</b>	<b>Ciclo replicativo do CHIKV</b> .....	<b>20</b>
<b>1.5</b>	<b>Diversidade genética do CHIKV</b> .....	<b>22</b>
<b>1.6</b>	<b>Fisiopatogênese da febre chikungunya</b> .....	<b>24</b>
<b>1.7</b>	<b>Manifestações clínicas</b> .....	<b>28</b>
<i>1.7.1</i>	<i>Fase aguda</i> .....	<i>28</i>
<i>1.7.2</i>	<i>Fase pós-aguda</i> .....	<i>29</i>
<i>1.7.3</i>	<i>Fase crônica</i> .....	<i>29</i>
<i>1.7.4</i>	<i>Formas atípicas e graves</i> .....	<i>29</i>
<b>1.8</b>	<b>Diagnóstico laboratorial do CHIKV</b> .....	<b>31</b>
<i>1.8.1</i>	<i>Isolamento viral</i> .....	<i>31</i>
<i>1.8.2</i>	<i>Testes sorológicos</i> .....	<i>31</i>
<i>1.8.3</i>	<i>Reação em cadeia da polimerase em tempo real</i> .....	<i>31</i>
<i>1.8.4</i>	<i>Imunohistoquímica</i> .....	<i>32</i>
<b>1.9</b>	<b>Epidemiologia da chikungunya</b> .....	<b>33</b>
<i>1.9.1</i>	<i>Chikungunya no mundo</i> .....	<i>33</i>
<i>1.9.2</i>	<i>Chikungunya no Brasil</i> .....	<i>33</i>
<i>1.9.3</i>	<i>Chikungunya no Ceará</i> .....	<i>34</i>
<b>1.10</b>	<b>Comitê e Serviço de Verificação de Óbitos (SVO)</b> .....	<b>35</b>
<b>1.11</b>	<b>Relevância do estudo</b> .....	<b>36</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral</b> .....	<b>38</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos</b> .....	<b>38</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Tipo de estudo</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2</b>	<b>População de estudo</b> .....	<b>39</b>
<b>3.3</b>	<b>Definição de casos</b> .....	<b>39</b>
<b>3.4</b>	<b>Comitê de ética</b> .....	<b>40</b>
<b>3.5</b>	<b>Diagnóstico laboratorial</b> .....	<b>40</b>

3.5.1	<i>Testes sorológicos</i> .....	40
3.5.2	<i>Extração do RNA viral</i> .....	40
3.5.3	<i>Diagnóstico de arbovírus por RT-qPCR em tempo real</i> .....	41
3.5.4	<i>Imunohistoquímica</i> .....	42
3.6	Sequenciamento genômico completo do CHIKV na plataforma MinIon .....	42
3.7	Estudo filogenético do CHIKV no Ceará.....	43
3.7.1	<i>Conjunto de dados de CHIKV</i> .....	43
3.7.2	<i>Análises filogenéticas de máxima verossimilhança</i> .....	43
3.7.3	<i>História espaço-temporal e demográfica do CHIKV no Ceará</i> .....	43
3.7.4	<i>Disponibilidade de dados</i> .....	44
3.8	Análises estatísticas.....	44
3.9	Dados epidemiológicos.....	44
4	RESULTADOS.....	46
5	DISCUSSÃO .....	54
6	PERSPECTIVAS .....	60
7	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS.....	62
	ANEXO 1 .....	73
	ANEXO 2 .....	77

# 1 INTRODUÇÃO

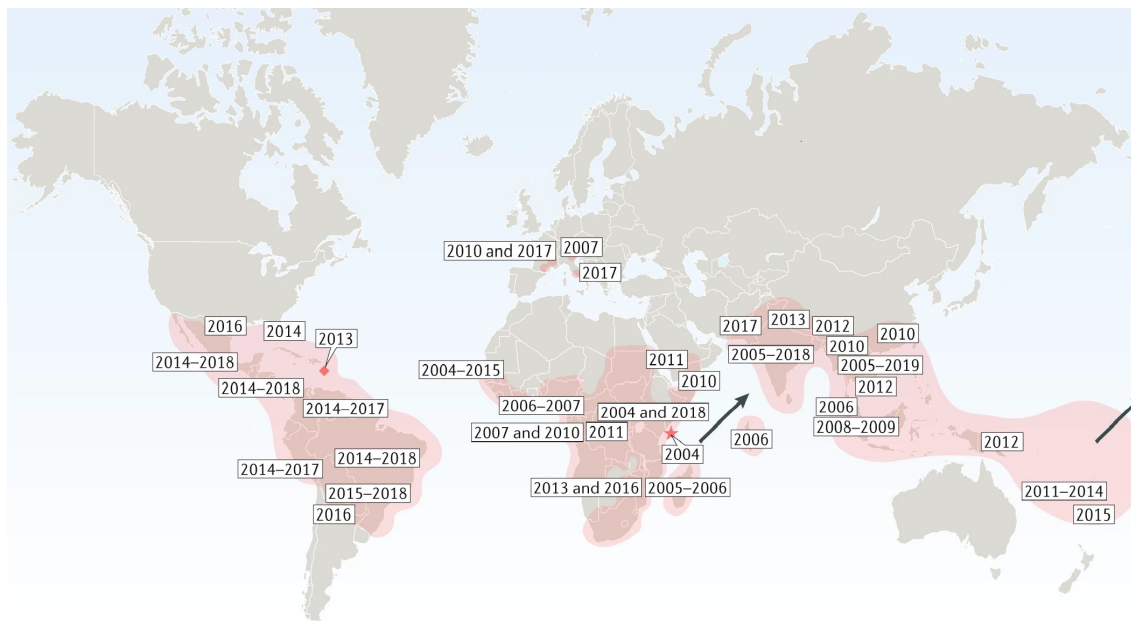
## 1.1 Histórico

O vírus Chikungunya (CHIKV) foi descoberto em amostras séricas de um paciente com doença febril na Tanzânia em 1952 (ROSS, 1956). A palavra chikungunya é derivada da língua Makonde (Kimakonde), um dos idiomas falados no sudeste da Tanzânia, e significa “curvar-se ou tornar-se contorcido”, referindo-se à postura adotada pelo paciente devido à intensa dor articular grave presente nas infecções graves pelo CHIKV (ROBINSON MC, 1955).

Entre os anos de 1960 e 1990, o vírus foi isolado numerosas vezes em surtos no continente africano, incluindo Senegal, Benin, Guiné, Costa do Marfim e Nigéria (AZEVEDO, 2015). A partir da década de 60, surtos frequentes também foram descritos em países do sudeste asiático como Índia, Malásia, Indonésia, Camboja, Vietnã, Mianmar, Paquistão e Tailândia (POWERS, 2007). Entre 1999 e 2000, o CHIKV causou uma nova epidemia na Kinshasa, capital da República Democrática do Congo, após 39 anos sem a presença do vírus (PASTORINO *et al.*, 2004). Entre 2001 e 2003, o vírus ressurgiu na Indonésia depois de 20 anos sem sua detecção (LARAS *et al.*, 2004). Em 2004, o CHIKV foi detectado no Quênia, dispersando-se rapidamente pelas ilhas do Oceano Índico (Comores, Madagascar, Mayotte, Ilhas Seychelles, Maurícias, Ilhas da Reunião), o que resultou em uma epidemia em 2005 e 2006 (TSETSARKIN, 2007). A partir deste período, foram descritas possíveis infecções por CHIKV com observações de casos graves com apresentações atípicas, como por exemplo, envolvimento neurológico e óbitos. Além disso, a transmissão pelo *Ae. albopictus* – um dos vetores transmissores da chikungunya – nas Ilhas da Reunião levou à hipótese de um novo genótipo, possivelmente mais virulento (WEAVER, 2014).

A partir deste primeiro surto no Quênia, estabeleceu-se a maior epidemia de chikungunya já registrada. Houve uma expansão não apenas na África, Índia e Ásia, como um deslocamento que culminou no espalhamento do CHIKV também na América Central e do Sul, com casos ainda relatados em 2018/2019 (Figura 1).

Figura 1. Emergência e dispersão da epidemia de CHIKV de 2004 a 2019.



Fonte: SUHRBIER, A. (2019).

Figura 1. Em 2004, começou na ilha de Lamu, no Quênia (estrela vermelha), o primeiro surto da maior epidemia de chikungunya já registrado. A epidemia então se expandiu para o oeste da África, e também se espalhou para o leste, através das ilhas do Oceano Índico até a Ásia. A epidemia cresceu na Índia e no sudeste da Ásia, deslocou-se para o leste nas ilhas do Pacífico e atingiu o Caribe (Ilha de Saint Martin) em 2013 (diamante vermelho), sendo o primeiro local nas Américas a relatar a transmissão autóctone do CHIKV. A partir daí, o CHIKV se espalhou para a América Central e do Sul, e casos ainda estavam sendo relatados em 2018/2019. Pequenos surtos também ocorreram na Europa e no sul dos EUA.

## 1.2 Classificação, genoma e estrutura do CHIKV

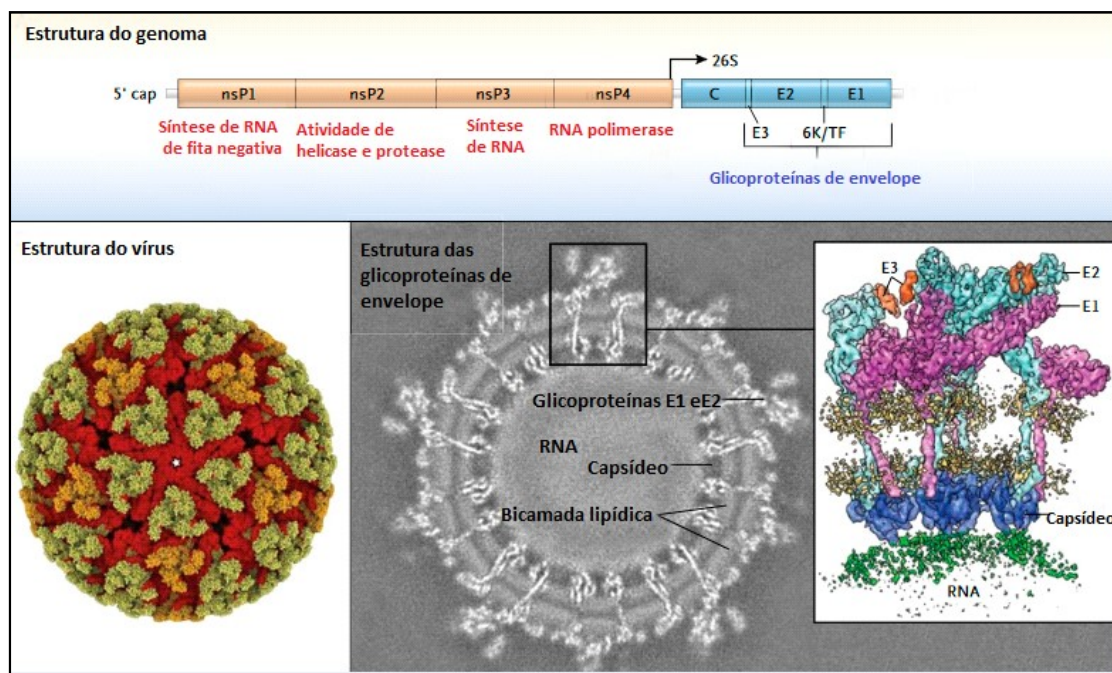
CHIKV é um arbovírus do gênero *Alfavírus*, que pertence à família *Togaviridae*. O vírus tem cerca de 60-70 nm de diâmetro e possui capsídeo de simetria icosaédrica (STRAUSS; STRAUSS, 1994) e envelope lipídico, onde localizam-se as glicoproteínas virais E1 e E2, além da glicoproteína E3 que está presente na periferia. As glicoproteínas E1 e E2 associam-se em heterodímeros, formando 80 trímeros (UCHIME *et al.*, 2013). O nucleocapsídeo é constituído de uma proteína C do capsídeo viral e de uma molécula de RNA (STRAUSS; STRAUSS, 1986).

CHIKV é envelopado, possui genoma RNA positivo de fita simples com tamanho aproximado de 12Kb (SOLIGNAT, 2009) e dois quadros abertos de leitura (*Open Reading Frame – ORFs*). O primeiro, localizado à 5' do genoma, codifica quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) e o segundo, localizado à 3' do genoma, em região controlada por um promotor subgenômico, codifica cinco proteínas estruturais (STRAUSS;



STRAUSS, 1994): proteína C, o peptídeo sinal para E1 (6k) e as glicoproteínas E1, E2 e E3 (Figura 2) (WEAVER S. C. and LECUIT M., 2015).

Figura 2. Estrutura do CHIKV e seu genoma.



Fonte: WEAVER and LECUIT, 2015 (Adaptação).

Figura 2. Estrutura do genoma, mostrando as quatro proteínas não estruturais e as cinco proteínas estruturais. Estrutura do vírus. Estrutura das glicoproteínas de envelope, mostrando as glicoproteínas E1, E2 e E3, capsídeo, RNA e bicamada lipídica.

Cada proteína não estrutural tem funções específicas durante a infecção. A proteína não estrutural 1 (nsP1) está envolvida no encapsulamento do RNA viral de cadeia positiva, possui atividade de guanina-7-metiltransferase e guaniltransferase, e funciona como uma âncora da membrana do complexo de replicação (RUPP *et al.*, 2015). A proteína não estrutural 2 (nsP2) está envolvida com o processamento autocatalítico do polipeptídeo das proteínas não estruturais, apresentando três relevantes funções: helicase, trifosfatase e protease (MERITS *et al.*, 2001). Consoante a essas funções, a nsP2 está intimamente envolvida na inativação da síntese macromolecular da célula hospedeira (FROLOVA *et al.*, 2010; KIIVER *et al.*, 2008). Proteína altamente fosforilada, a proteína não estrutural 3 (nsP3) é essencial no complexo de replicação (RUPP *et al.*, 2015). Uma análise funcional da nsP3 revelou a presença de um sinal de degradação na região C-terminal que se sobrepõe com um elemento de sequência localizado entre nsP3 e nsP4, que é necessário para o processamento proteolítico (VARJAK; ZUSINAITE; MERITS, 2010). Por sua vez, a proteína não estrutural

4 (nsP4) atua como RNA polimerase RNA-dependente, produzindo o RNA complementar negativo que serve de molde para a replicação do genoma viral, o que faz dela a primeira proteína não estrutural a ser proteoliticamente clivada (FROS; PIJLMAN, 2016).

As proteínas estruturais C, E3, E2, 6K e E1 formam as partículas virais. A proteína do capsídeo C envolve o RNA sintetizado, por reconhecer sinais de encapsulamento específicos (LEUNG *et al.*, 2011). A glicoproteína E2 participa do processo de adsorção, tendo em vista que estabelece uma ligação entre a partícula viral e os receptores da célula hospedeira. Já a glicoproteína E1 é encarregada de promover a fusão do envelope viral com a membrana do endossomo a fim de liberar o nucleocapsídeo no citosol da célula (SOLIGNAT *et al.*, 2009). O papel da glicoproteína E3 parece variar entre diferentes alfavírus (LEUNG *et al.*, 2011). A proteína 6k é responsável por atuar na montagem da partícula viral (SOLIGNAT *et al.*, 2009) e também funciona como canal iônico seletivo capaz de alterar a permeabilidade da membrana celular (LEUNG *et al.*, 2011). (Tabela1)

Tabela 1. CHIKV: proteínas e funções das proteínas.

Proteínas	Função
<b>Proteínas Não Estruturais</b>	
nsP1	Atividade de metiltransferase e guanililtransferase que encapsula o RNA viral; âncora de membrana única para complexo de replicação.
nsP2	Processamento autocatalítico do polipeptídeo, apresentando três relevantes funções: helicase, trifosfatase e protease; inativação da síntese macromolecular da célula hospedeira.
nsP3	Essencial no complexo de replicação.
nsP4	Atua como RNA polimerase RNA-dependente, produzindo o RNA de sentido negativo complementar que serve de molde para a replicação do genoma viral.
<b>Proteínas Estruturais</b>	
Capsídeo C	Envolve o RNA sintetizado, reconhecendo sinais de encapsulamento específicos.
E3	Parece variar entre diferentes alfavírus.
E2	Participa do processo de adsorção, tendo em vista que estabelece uma ligação entre a partícula viral e os receptores da célula hospedeira.
E1	Promover a fusão do envelope viral com a membrana do endossomo a fim de liberar o nucleocapsídeo no citosol da célula.
6k	Atuar na montagem da partícula viral; funciona como canal iônico seletivo, capaz de alterar a permeabilidade da membrana celular.

---

Fonte: Autora.

### 1.3 Ciclo de transmissão do CHIKV

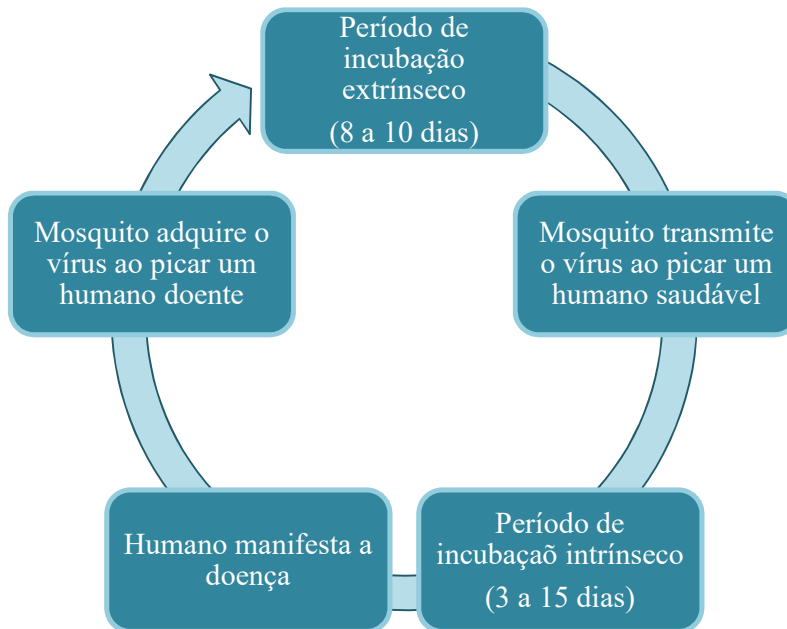
O CHIKV é um arbovírus (*arthropod-borne virus*) que tem como principais vetores os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (MOURYA and MISHRA, 2006). O *Ae. aegypti* está presente nos trópicos e subtropicais – em praticamente todo o continente americano, no Sudeste da Ásia, e em toda a Índia (KRAEMER *et al.*, 2015). O *Ae. albopictus*, originário da Ásia, possui a capacidade de tolerar baixas temperaturas (KRAEMER *et al.*, 2015) e demonstra preferências por ambientes rurais, semissilvestres e silvestres. Trata-se de uma espécie que atua como vetor secundário dos arbovírus em zonas rurais e urbanas. No Brasil, ainda não foi associado a surtos ou epidemias da doença, mas sob condições experimentais, mostra-se competente à infecção e à transmissão de 22 outros arbovírus (MARTINS *et al.*, 2010). Sua presença foi registrada pela primeira vez aqui no Brasil, em 1986, no Rio de Janeiro, expandindo-se posteriormente, para os estados do Espírito Santo, Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (BALESTRA *et al.*, 2008). Desde então, tem-se observado sua crescente e acelerada expansão pelo país (PESSOA *et al.*, 2013).

A principal forma de transmissão do CHIKV é a vetorial, que ocorre pela picada de fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas (BRASIL, 2019). Após o período de incubação extrínseca, que varia de oito a doze dias, os mosquitos, altamente antropofílicos, iniciam a transmissão humano-mosquito-humano devido a necessidade das fêmeas realizarem a hematofagia para maturação dos seus ovos (BRASIL, 2014; ROUGERON *et al.*, 2015), determinando desta forma um novo ciclo (GUBLER, 1998; MCBRIDE; BIELEFELDT-OHMANN, 2000) (Figura 3).

A transmissão perinatal pode ocorrer em casos de gestantes virêmicas, muitas vezes provocando infecção neonatal grave. Em 2018, foi realizado um estudo de caso do primeiro óbito materno-infantil após provável transmissão vertical do CHIKV, na cidade de Fortaleza - Ceará, durante a epidemia de chikungunya em 2017 (OLIVEIRA *et al.*, 2018). No entanto, estudos apontam que a transmissão vertical do CHIKV é rara, ocorrendo antes da 22<sup>a</sup> semana de gestação (BRASIL, 2019).

A transmissão pelo sangue também é possível. Existem casos documentados de infecções adquiridas por profissionais de laboratório que manipularam sangue infectado. A possibilidade de transmissão através da transfusão de sangue ou hemocomponentes e doação de órgãos para transplantes também gera profunda preocupação. A presença do vírus foi detectada em córneas doadas para transplante e sua transmissão para camundongos foi evidenciada (FERNANDEZ; NAVARRO, 2015).

Figura 3. Período de incubação intrínseco e extrínseco.



Fonte: Center for Disease Control and Prevention (CDC) e Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) (Adaptação).

Figura 3. Período de incubação extrínseco, que dura de 8 a 10 dias e ocorre quando o mosquito adquire o vírus ao picar um humano doente, e período de incubação intrínseco, com duração de 3 a 15 dias e ocorre no hospedeiro após a transmissão do vírus pelo mosquito para o humano saudável.

#### 1.4 Ciclo replicativo do CHIKV

Para que o ciclo replicativo do CHIKV inicie, é necessário que haja a ligação das glicoproteínas de superfície com os receptores celulares específicos, os quais não foram ainda muito bem elucidados. No entanto, acreditam-se que os prováveis receptores sejam os glicosaminoglicanos, as moléculas DC-SIGN (molécula não integrina, captadora da molécula de adesão intercelular e específica das células dendríticas) e a laminina (CHEVILLON *et al.*, 2008).

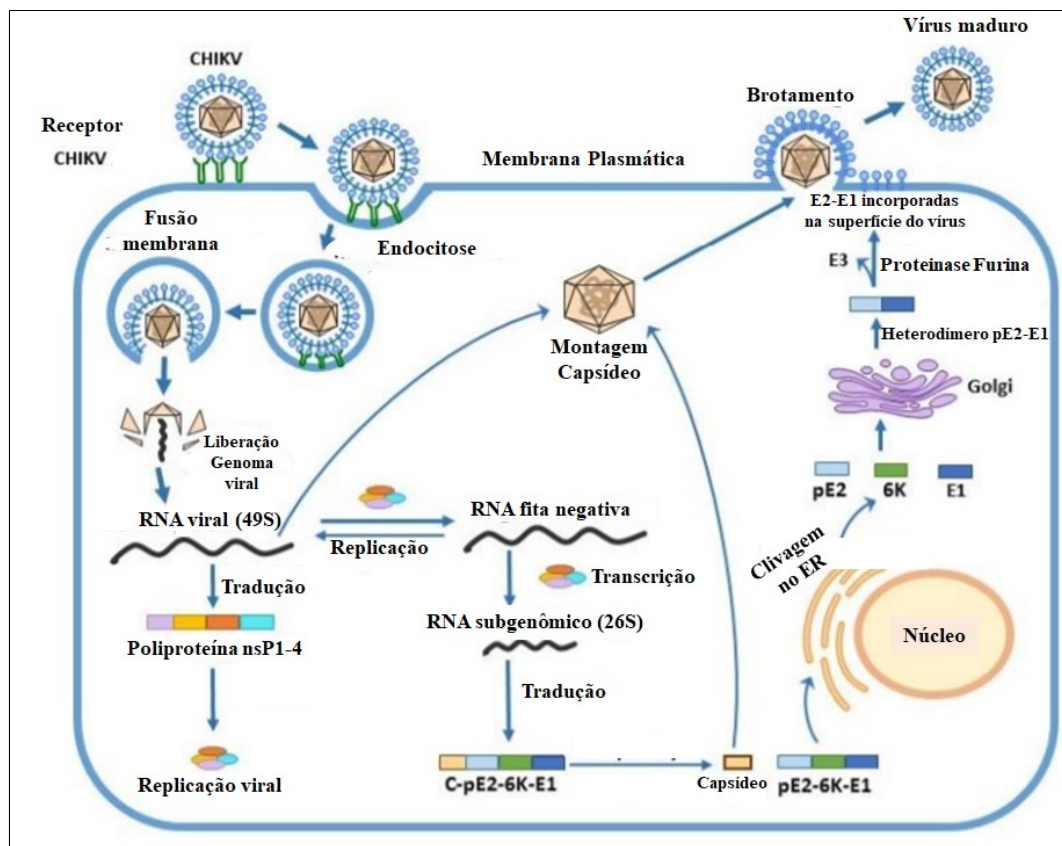
Mudanças conformacionais das glicoproteínas do envelope acontecem, após a entrada da partícula viral nas células-alvo por endocitose revestidas com clatrina, devido ao pH ácido do endossoma, fazendo com que o heterodímero E1-E2 reorganize-se e exponha o peptídeo de fusão de E1, permitindo a fusão do envelope viral com a membrana do endossoma (SOLIGNAT *et al.*, 2009), liberando assim, o nucleocapsídeo no citoplasma da célula-alvo (CHEVILLON *et al.*, 2008). Neste processo destacam-se as glicoproteínas estruturais E1 e E2, que atuam respectivamente na fusão da membrana e na endocitose do material antigênico do CHIKV para a célula hospedeira (LI *et al.*, 2011).

No citoplasma da célula infectada por CHIKV, em semelhança ao mecanismo de replicação de outros alfavírus, são formados vacúolos, onde é realizada a montagem do vírus por meio da ligação do nucleocapsídeo ao RNA viral e do recrutamento das glicoproteínas do envelope associadas à membrana (SCHWARTZ; ALBERT, 2010).

O RNA viral livre no citosol da célula é diretamente traduzido em uma poliproteína precursora que, após sofrer clivagens proteolíticas por ação de proteases virais e da própria célula, dará origem às quatro proteínas virais não estruturais (nsPs). Essas nsPs associam-se e formam um complexo de replicação funcional que promove a transcrição do RNA viral em uma fita de RNA polaridade negativa, com o tamanho completo do genoma, que servirá como molde de replicação para a síntese dos RNAs genômico 49S e o subgenômico 26S (SOLIGNAT *et al.*, 2009; LUM *et al.*, 2015).

As proteínas estruturais são obtidas a partir do RNA subgenômico 26S (+), produzido por sua vez, na região interna ribossomal na fita de RNA (-) (STRAUSS; STRAUSS, 1994). Após a tradução, o polipeptídeo sintetizado C-pE2-6K-E1 é processado para liberar a proteína do capsídeo no citoplasma celular, e o polipeptídeo pE2-6K-E1 resultante é transportado ao retículo endoplasmático, onde sofrerá modificações pós-traducionais tornando-se o heterodímero pE2-E1, que então será transportado ao Complexo de Golgi (GAROFF; SJOBERG; CHENG, 2004). Do Complexo de Golgi, o heterodímero pE2-E1 migra para a superfície celular. Durante essa etapa a pE2 é clivada por uma proteinase furina (ou uma outra proteinase semelhante) para formar as glicoproteínas E2 e E3. Posteriormente, as glicoproteínas E1 e E2 formarão um dímero que será transportado para a membrana plasmática da célula hospedeira, onde será então incorporado sob a forma de espículas triméricas, na superfície da membrana (EKSTROM *et al.*, 1994). Simultaneamente, as proteínas do capsídeo, no citoplasma, irão associar-se para formar um nucleocapsídeo icosaédrico contendo o RNA genômico 49S. Durante o brotamento, o nucleocapsídeo liga-se à glicoproteína E2 por um processo de maturação e será então direcionado à membrana celular (SUOMALAINEN *et al.*, 1992). Durante esta etapa, o vírion maduro irá adquirir uma bicamada de membrana proveniente da célula hospedeira (SOLIGNAT *et al.*, 2009, LUM & NG, 2015). A montagem viral é guiada eletrostaticamente pela ligação do nucleocapsídeo e pelo recrutamento de glicoproteínas associadas às membranas. A partícula de forma icosaédrica montada, finalmente, brota na membrana da célula e torna-se um vírion envelopado, uma partícula viral completa, infectiva (KIELIAN; REY, 2006) (Figura 4).

Figura 4. Ciclo replicativo do CHIKV.



Fonte: ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2015 (Adaptação).

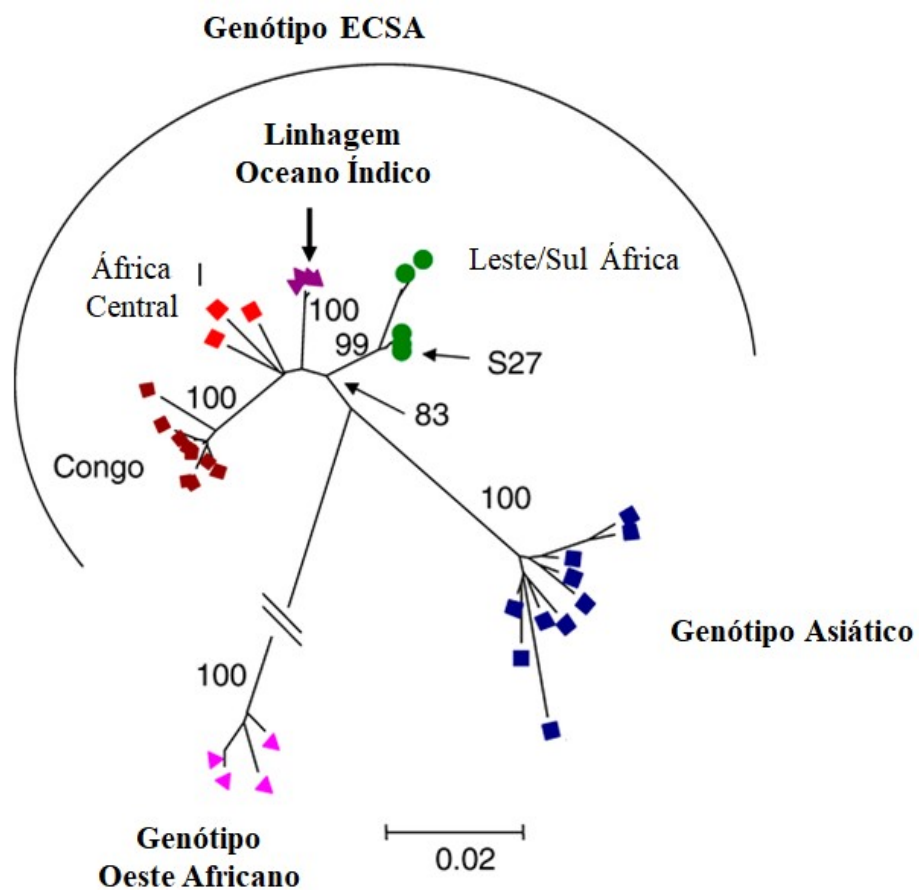
Figura 4. O CHIKV entra na célula por endocitose após a ligação da proteína E2 a receptor (es) específico (s) na superfície celular. No endossomo, o baixo pH desencadeia a fusão do envelope viral com a membrana endossomal, levando à liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. O nucleocapsídeo se desmonta para liberar o genoma viral, que é traduzido para produzir as proteínas não estruturais virais (nsP1–4). Após o processamento, as proteínas não estruturais complexam para formar a replicase viral, que catalisa a síntese de uma fita de RNA de sentido negativo para servir como um modelo para a síntese do genoma de sentido positivo de comprimento total e do RNA subgenômico (26S). O RNA subgenômico (26S) é traduzido para produzir a poliproteína estrutural (C-E3-E2-6K-E1), que é então clivada para produzir as proteínas estruturais individuais, seguido pela montagem dos componentes virais. A partícula de vírus montada é liberada por brotamento através da membrana plasmática, onde adquire o envelope com as glicoproteínas virais.

### 1.5 Diversidade genética do CHIKV

O CHIKV possui apenas um sorotipo, que confere imunidade ao indivíduo que foi por ele acometido. A análise filogenética, porém, distingue três genótipos para o CHIKV: o Oeste Africano, o Leste-Centro-Sul Africano (ECSA) e o Asiático (POWERS *et al.*, 2000). A cepa ECSA deu origem à linhagem do Oceano Índico (IOL), responsável por epidemias nas Ilhas do Oceano Índico, Índia Ocidental e Europa nos anos de 2004-2005 (Figura 5). Sua expansão foi atribuída a mutações adaptativas nos genes das glicoproteínas E1 e E2 do envelope do vírus, que permitiram tanto sua adaptação ao *Ae. albopictus* (VOLK *et al.*, 2010),

quanto o aumento da gravidade e, conseqüentemente, a rapidez de propagação da epidemia em países cujo principal vetor era o *Ae. albopictus* (SCHUFFENECKER *et al.*, 2006). Essas mutações estão associadas à substituição do aminoácido Alanina na posição 226 da glicoproteína E1 pela Valina, dando origem à mutação E1- A226V (THIBOUTOT *et al.*, 2010).

Figura 5. Genótipos de chikungunya e a origem da linhagem do Oceano Índico.



Fonte: SCHUFFENECKER *et al.*, 2006.(Adaptação)

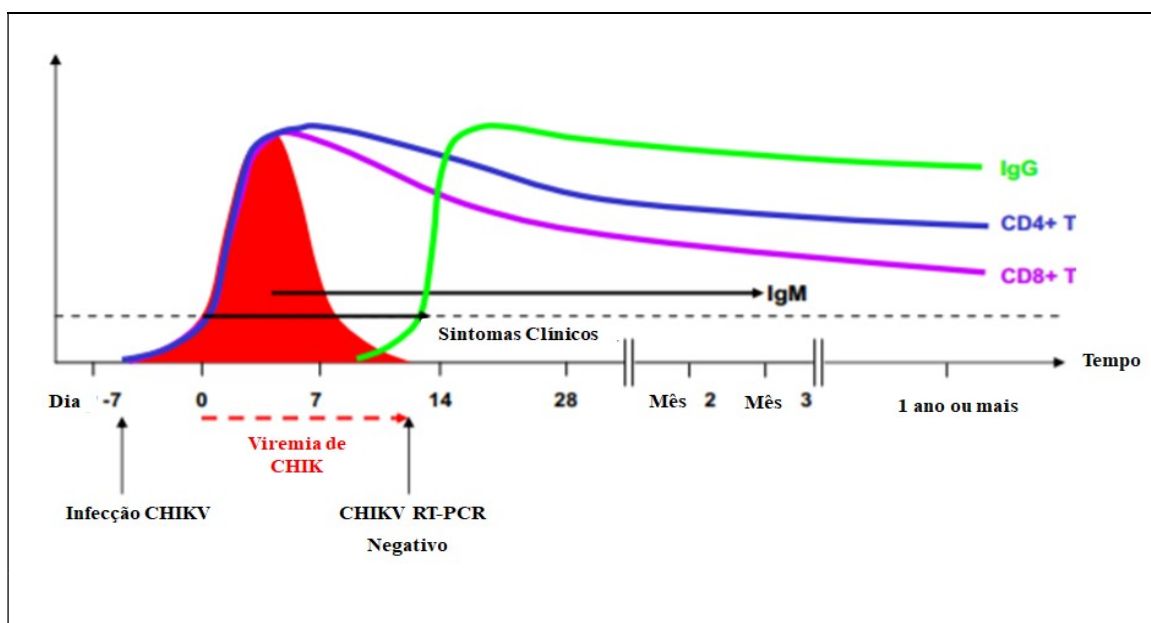
Figura 5. Cepas do surto do Oceano Índico (Reunião, Seychelles, Mayotte, Maurício e Madagascar) representam um clado distinto dentro de um grande filogrupa da África Oriental, Central e do Sul (ECSA).



## 1.6 Fisiopatogênese da chikungunya

Após sua transmissão, o CHIKV infecta o tecido subcutâneo e células residentes da pele, tais como fibroblastos, células dendríticas e macrófagos (SOURISSEAU *et al.*, 2007). As partículas virais são capturadas por células dendríticas, as quais migram para gânglios linfáticos, com o objetivo de apresentar os antígenos para o sistema imunológico. A infecção por CHIKV ativa as células da resposta imune inata, com a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, dentre as quais se destacam os interferons do tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 e TNF $\alpha$  (KELVIN *et al.*, 2011). A detecção do RNA viral por células de defesa pode levar à ativação de promotores dos genes para IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , mediante fatores de regulação, como o IRF-3 e o IRF-7 (SCHILTE *et al.*, 2012). A infecção aguda em humanos leva à ativação e proliferação de células T CD8<sup>+</sup>, enquanto uma resposta de células T CD4<sup>+</sup> é dominante durante a fase crônica da chikungunya (SILVA & DERMODY, 2017). (Figura 6)

Figura 6. Resposta imune ao CHIKV.

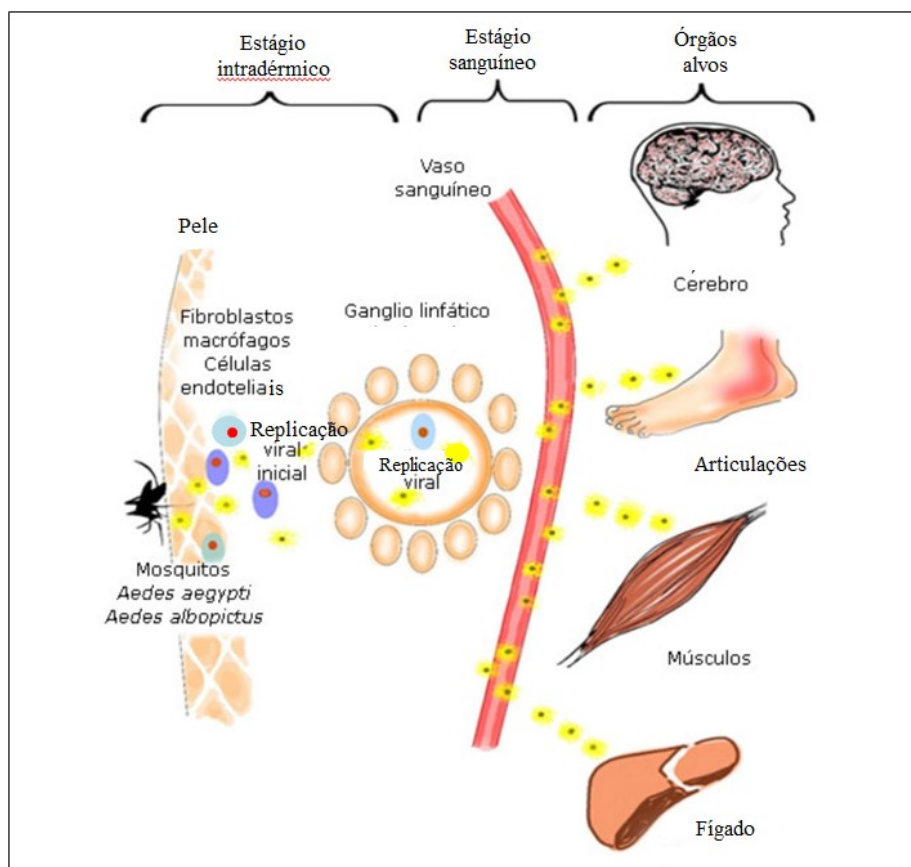


Fonte: KAM *et al.*, 2009 (Adaptação).

Figura 6. A viremia do CHIKV no sangue dura entre 2 e 10 dias (carga viral na área preenchida com vermelho). Células T CD4<sup>+</sup> específicas e células T CD8<sup>+</sup> são expandidas correspondendo à infecção por CHIKV. A rápida eliminação do vírus ocorre antes do aparecimento dos anticorpos IgG. Os sintomas clínicos desaparecem quando a viremia do CHIKV cai abaixo do nível de detecção.

Os vírus transportados pelas células atingem rapidamente o sistema circulatório, espalhando-se por diferentes locais, como músculos, articulações, fígado e cérebro (SOURISSEAU *et al.*, 2007) (Figura 7). Os mecanismos fisiopatológicos da dor musculoesquelética e da artrite crônica após infecção pelo CHIKV são parcialmente conhecidos. Acredita-se que esses sintomas sejam decorrentes do escape precoce do CHIKV do interior dos monócitos e consequente relocação nos macrófagos sinoviais. Essa hipótese tem sido reforçada pela observação da persistência, por tempo prolongado, do CHIKV em tecidos musculares, articulares, hepático e linfóide (LABADIE *et al.*, 2010). A falha nos mecanismos reguladores da resposta imunológica do hospedeiro pode ser a causa da inflamação persistente no tecido sinovial manifestada como artrite crônica (SOURISSEAU *et al.*, 2007).

Figura 7. Fisiopatologia da infecção pelo CHIKV.



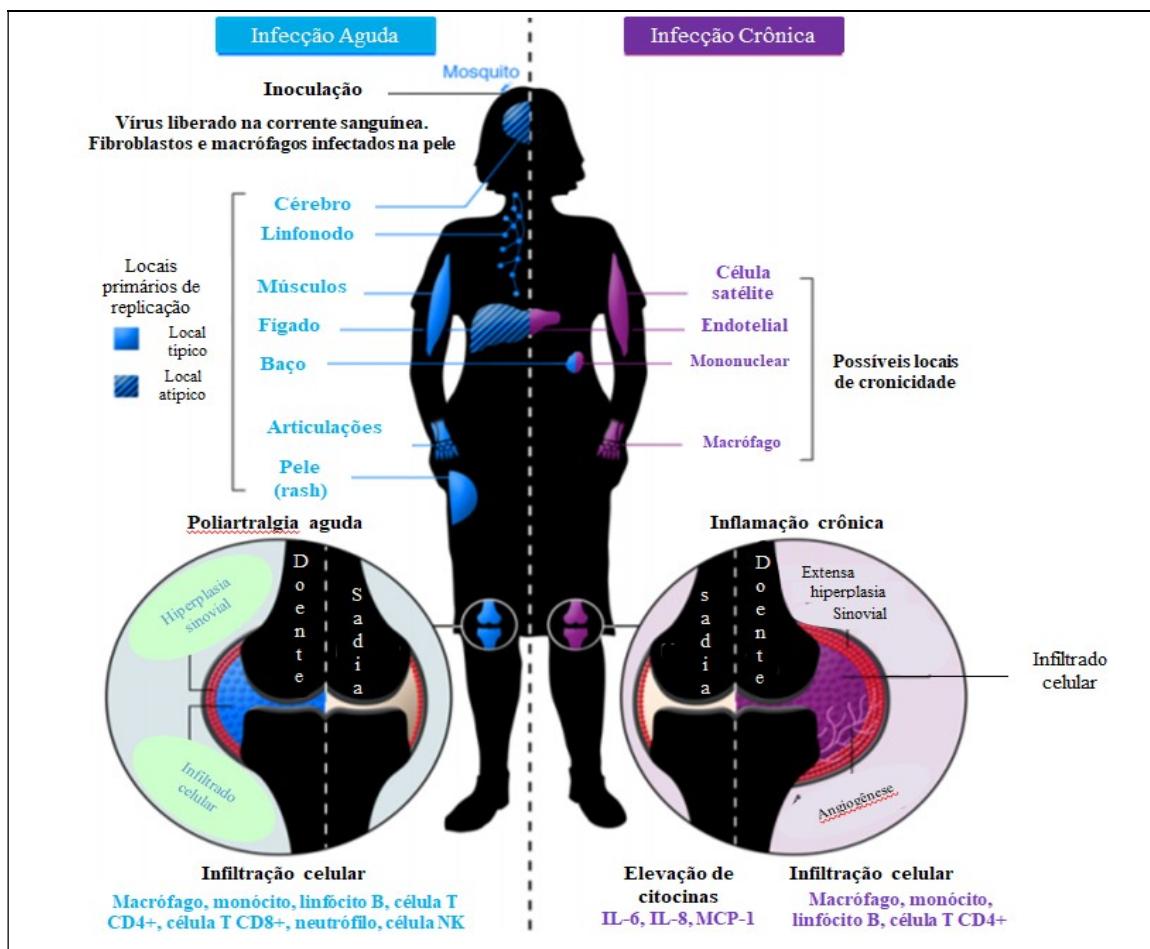
Fonte: FERNANDEZ & NAVARRO, 2015(Adaptação).

Figura 7. O mosquito, através da picada, introduz o vírus ao nível intradérmico e entram nos capilares subcutâneos. Então ocorre uma replicação viral local ao nível de células que são susceptíveis, como os fibroblastos, as células endoteliais e os macrófagos. Posteriormente, chega aos nódulos linfáticos locais onde também ocorre a replicação viral. Nesse momento, o vírus é drenado através da circulação sanguínea até alcançar os órgãos alvos: fígado, músculo, articulações, cérebro.

Os vírus replicam-se no interior de monócitos e macrófagos, que uma vez infectados entram na corrente sanguínea causando viremia e levando os vírus para órgãos-alvo específicos, principalmente as articulações, baço, fígado, músculos, cérebro dentre outros (DE FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014). As células monocíticas migram para os tecidos sinoviais contribuindo de forma significativa para a inflamação persistente nas articulações, apesar da ausência de vírus no sangue durante a fase crônica da doença (TSETSARKIN *et al.*, 2007).

Em modelos animais, as respostas imunes inatas desencadeadas pela replicação viral recrutam células inflamatórias para tecidos musculoesqueléticos infectados, que parecem contribuir para o dano muscular e articular, resultando em dor e desconforto nos músculos, articulações e tendões (SILVA & DERMODY, 2017). Embora a viremia geralmente seja eliminada 5–7 dias após a infecção e a maioria dos sintomas agudos desapareça ou diminua em 2 semanas, as manifestações reumáticas podem persistir por meses ou até mesmo anos (SILVA & DERMODY, 2017). A maioria dos pacientes apresenta distúrbios musculoesqueléticos e geralmente responde parcialmente a analgésicos, tratamentos antiinflamatórios e fisioterapia. No entanto, aproximadamente 5% dos pacientes atendem aos critérios de reumatismo inflamatório crônico, que pode ser destrutivo e deformante (SILVA & DERMODY, 2017). (Figura 8)

Figura 8. Tropismo do CHIKV em humanos.



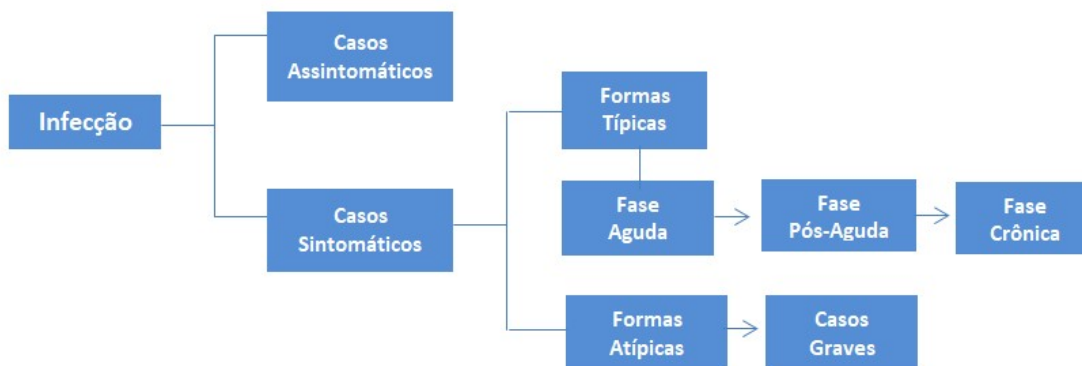
Fonte: SILVA & DERMODY, 2017 (Adaptação).

Figura 8. A infecção aguda por CHIKV começa com a transmissão do vírus através da picada de um mosquito infectado para a pele, onde se replica em células suscetíveis, incluindo fibroblastos e macrófagos. O vírus se dissemina através dos vasos linfáticos e da corrente sanguínea para locais típicos e atípicos de replicação primária (indicados em azul). A infecção aguda desencadeia uma resposta inflamatória em tecidos infectados, caracterizada por uma extensa infiltração de principalmente macrófagos e monócitos, mas também neutrófilos, células NK e linfócitos em tecidos-alvo (indicados em azul) e pela elaboração de uma série de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. Dentro dos tecidos artroesqueléticos, a hiperplasia sinovial começa. A replicação viral e as respostas imunes do hospedeiro causam mialgia e poliartralgia nas articulações distais. A doença crônica por CHIKV pode persistir por meses ou anos após a infecção aguda, mas geralmente é limitada a articulações mais distais. A doença crônica é provavelmente mediada por vírus e inflamação persistentes. Os possíveis locais de persistência do CHIKV incluem células endoteliais no fígado e outros órgãos, células mononucleares no baço, macrófagos no líquido sinovial e tecidos circundantes e células satélites no músculo (indicadas em roxo). Dentro da articulação cronicamente infectada, a presença contínua de um subconjunto de células infiltrantes (principalmente macrófagos, monócitos e linfócitos) e mediadores pró-inflamatórios específicos (IL-6, IL-8 e MCP-1) dentro do líquido sinovial provavelmente contribuem para o prolongamento da doença inflamatória. A patologia articular crônica assemelha-se à da artrite reumatóide, com hiperplasia e angiogênese significativas. Este modelo é baseado em estudos em humanos e animais.

## 1.7 Manifestações clínicas

Nos achados clínicos da chikungunya, a maioria dos infectados apresentam sintomatologia, sendo raros os pacientes assintomáticos (GOUPIL; MORES, 2016). Alguns estudos mostram que o percentual de sintomáticos pode chegar a 70%, um número alto e significativo quando comparado às demais arboviroses, e que gera, conseqüentemente, uma sobrecarga nos serviços de saúde (BRASIL, 2017). A doença pode evoluir de forma típica, em três fases: aguda ou febril, pós-aguda e crônica; e de forma atípica, em casos graves. (Figura 9). (Tabela 2)

Figura 9. Espectro clínico da chikungunya.



Fonte: BRASIL. SVS/MS. 2017 (Adaptação).

### 1.7.1 Fase Aguda

Período considerado de alta viremia, a fase aguda caracteriza-se pelos seguintes sintomas: febre alta de início súbito, dores e edemas nas articulações. Queixas clínicas de cefaleia, dores nas costas, mialgia, náuseas/vômitos, diarreia, fotofobia, dor retro orbital e *rush* cutâneo também são frequentemente relatados em pacientes nessa fase (DINIZ *et al.*, 2017). Também são queixas frequentes, a rigidez articular matinal, limitação para realizar atividades cotidianas, exantema macopapular e prurido, assim como a descompensação de comorbidades. A poliartralgia bilateral e simétrica de articulações de tamanhos variados, principalmente a extremidade dos membros, tem sido relatada nas três fases da infecção,

embora possa haver assimetria principalmente em relação à sua intensidade. (BRASIL, 2019).

### ***1.7.2 Fase pós-aguda***

Na fase pós-aguda, que dura até três meses do início dos sintomas, pode-se ouvir relatos de recorrência de febre, melhora ou agravamento da artralgia, incluindo poliartrite distal e tenossinovite hipertrófica pós-aguda nas mãos e tornozelos, assim como edema de intensidade variável, astenia, prurido generalizado e exantema maculopapular. Alguns pacientes podem desenvolver doença vascular periférica, fadiga, alopecia e sintomas depressivos (BRASIL, 2019).

### ***1.7.3 Fase crônica***

A fase crônica caracteriza-se pela persistência da dor articular, musculoesquelética e neuropática de padrão contínuo ou recidivante, após três meses dos sintomas iniciais (BRITO *et al.*, 2016). Sua prevalência é bastante variável, podendo atingir mais de 50% dos pacientes. Além da dor com ou sem edema, limitação de movimento e rigidez articular matinal, pode também levar à deformidade ao longo dos anos. Os principais fatores de risco para as cronificações descritas até esse momento são: idade superior a 45 anos, artropatia preexistente e maior intensidade do quadro na fase aguda (BRASIL, 2019).

### ***1.7.4 Formas atípicas e graves***

Estudos de coorte e séries de casos, em diferentes países que enfrentaram epidemias deste alfavírus, mostram que pacientes portadores de comorbidades, como diabetes, hipertensão e doenças reumatológicas, apresentam risco aumentado de complicações e óbitos (DINIZ *et al.*, 2017; AZEVEDO *et al.*, 2015). Manifestações atípicas da doença podem ocorrer, caracterizadas pelo surgimento de manifestações clínicas menos frequentes. Cerca de 40% dos pacientes podem apresentar sintomas neurológicos, dos quais 10% poderão evoluir com manifestações persistentes. Neuropatia periférica com predomínio de componente sensitivo é a apresentação mais comum. Neuropatia motora é rara. Acredita-se que dor e parestesia podem estar associadas à neuropatia compressiva (CASTRO; LIMA; NASCIMENTO, 2016).

Tabela 2. Manifestações típicas e atípicas da doença CHIK em pacientes.

Órgão/Sistema	Manifestações Típicas	Manifestações Atípicas
Musculoesquelético	Artralgia; artrite; mialgia; edema articular; tenossinovite; dor lombar; poliartralgias persistentes ou recidivantes	Reumatismo inflamatório crônico; destruição articular
Dermatológico	Exantema; eritema	Dermatose bolhosa; hiperpigmentação; estomatite
Neurológico	Dor de cabeça	Meningoencefalite; encefalopatia; convulsões; anormalidades neurossensoriais; Síndrome de Guillain- Barré; paresia; paralisias; neuropatia
Gastrointestinal		Náusea; vômito; dor abdominal; anorexia; diarreia
Hematológico	Linfopenia; trombocitopenia	Hemorragia
Ocular	Dor retro-orbital; fotosensibilidade	Neurite óptica; retinite; uveíte
Cardiovascular		Miocardite; pericardite; insuficiência cardíaca; arritmias; cardiomiopatia
Hepático		Hepatite fulminante
Pulmonar		Parada respiratória; pneumonia
Renal		Nefrite; Insuficiência Renal Aguda

Fonte: SILVA & DERMODY, 2017.

## **1.8 Diagnóstico laboratorial do CHIKV**

O diagnóstico laboratorial da infecção por chikungunya baseia-se em três métodos principais: isolamento viral, teste sorológico, e reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) (Figura 10). Em casos de óbitos, pode-se utilizar também, a imunohistoquímica. A escolha do método de diagnóstico é dependente da data do início dos sintomas (PONGSIRI *et al.*, 2012). As amostras de sangue e soro são comumente utilizadas, contudo, o líquido cefalorraquidiano (LCR) também pode ser utilizado para o diagnóstico da doença nos episódios neurológicos (SIMMONS *et al.*, 2016).

### ***1.8.1 Isolamento viral***

O isolamento viral pode ser realizado em amostras de soro, LCR e sangue de pacientes na fase aguda, e em mosquitos coletados no campo. A amostra biológica coletado durante a primeira semana da doença, será processada e inoculada em uma linhagem de células sensíveis em cultura (Células Vero, BHK-21 ou células HeLa) ou em camundongos. O isolamento do CHIKV deve ser confirmado por imunofluorescência indireta (IFI) utilizando antissoro CHIKV específico, ou por RT-qPCR do sobrenadante da cultura celular ou da suspensão de cérebro de rato que foram previamente inoculados com as amostras biológicas supostamente infectadas (BRASIL, 2014).

### ***1.8.2 Testes sorológicos***

O diagnóstico sorológico envolve a captura de anticorpos IgM e IgG em resposta ao CHIKV nos indivíduos infectados. O IgM será detectado em soros de pacientes infectados, coletados do 3º ao 8º dia do início dos sintomas, e no período de 8 a 14 dias após a coleta da amostra na fase aguda, será detectado o IgG (PRAT *et al.*, 2014).

### ***1.8.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR)***

A detecção molecular, em comparação ao isolamento viral, oferece as vantagens de um diagnóstico mais rápido, sensível e efetivo, mostrando-se ideal para o uso em laboratório clínico, a partir da captura de sequências específicas do genoma do vírus em indivíduos infectados (JACOBSEN *et al.*, 2016). De maneira geral, a extração do RNA viral,

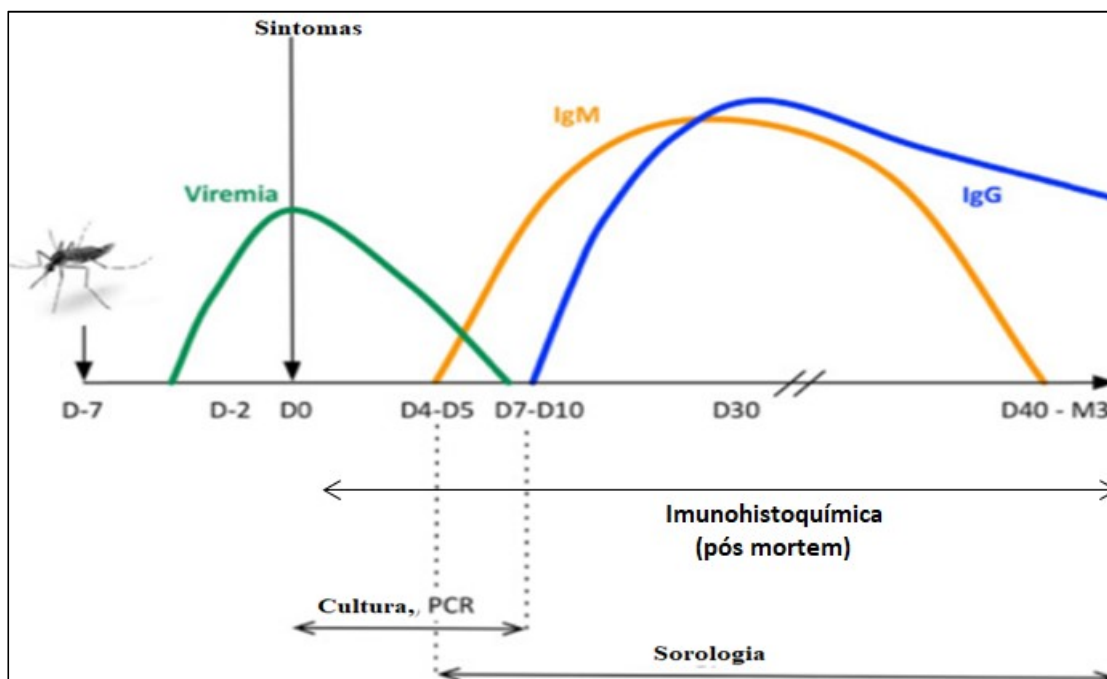


seguida da amplificação e detecção de forma quantitativa e em tempo real, resulta nos passos aplicados na RT-qPCR (WONG; MEDRANO, 2005).

#### 1.8.4 Imunohistoquímica (IHQ)

A utilização de métodos de imunohistoquímica permite a detecção de antígenos virais em casos com evolução fatal, a partir de amostras de tecidos fixados em formol (JESSIE *et al.*, 2004; VORNDAM; KUNO, 1997). De acordo com a metodologia preconizada por Hall (1991), a IHQ consiste em detectar os antígenos virais em secções de tecidos, explorando o princípio da ligação específica antígeno-anticorpo.

Figura 10. Diferentes métodos de diagnóstico da infecção por CHIKV.



FONTE: AMIN *et al.*, 2018 (Adaptação).

Figura 10. Na fase aguda, a viremia pode persistir até o 7º dia e o RNA genômico do CHIKV pode ser detectado por RT-PCR de forma confiável entre o 3º e 5º dia. Portanto, sugere-se que a detecção do RNA do CHIKV e o isolamento do vírus das amostras de soro para fins diagnósticos sejam feitos antes do dia 5, porque a chance de resultados falso-negativos aumenta com a diminuição da carga viral. Os anticorpos IgM e IgG contra o CHIKV começam a ser produzidos a partir do 4º-5º dia, para o IgM e a partir do 7º-10º dia para o IgG. Títulos estáveis de IgM podem ser detectados no soro até 4 meses, enquanto os níveis sustentados de IgG podem estar presentes por mais de anos.

## 1.9 Epidemiologia da chikungunya

### 1.9.1 *Chikungunya no mundo*

As arboviroses são um crescente problema de saúde pública no mundo principalmente pelo potencial de dispersão, pela capacidade de adaptação a novos ambientes e hospedeiros (vertebrados e invertebrados), pela possibilidade de causar epidemias extensas, pela susceptibilidade universal e pela ocorrência de grande número de casos graves, com acometimento neurológico, articular e hemorrágico (DONALISIO *et al.*, 2017).

O ressurgimento e a distribuição global de chikungunya em diferentes regiões geográficas devem-se a vários fatores, como globalização, expansão geográfica dos vetores, urbanização, viagens internacionais e mudanças climáticas (PIALOUX *et al.*, 2007).

Os achados epidemiológicos indicam que a distribuição global de *A. albopictus* e *A. aegypti*, bem como de viajantes, está envolvida na transmissão contínua da doença em locais previamente livres da infecção (WAHID *et al.*, 2017). Nas Américas, o surgimento do CHIKV ocorreu em dezembro de 2013 em Saint Martin e o vírus espalhou-se para 17 países da América do Sul até dezembro de 2014 (WAHID *et al.*, 2017).

### 1.9.2 *Chikungunya no Brasil*

Os primeiros casos autóctones de chikungunya no Brasil foram confirmados em Oiapoque, Amapá, em 13 de setembro de 2014 e foram causados pelo genótipo Asiático. Sete dias depois, casos autóctones causados pelo genótipo ECSA foram confirmados em Feira de Santana, Bahia, introduzido por um viajante infectado que havia recém voltado de Angola (BRASIL, 2014b; NUNES *et al.*, 2015). Desde então, o genótipo ECSA tem se espalhado para outros estados do Brasil (CHARLYS DA COSTA *et al.*, 2017; TANABE *et al.*, 2018).

O genótipo ECSA foi identificado no estado de Sergipe (CUNHA, M. D. P. *et al.*, 2017) a partir da introdução de uma cepa provavelmente oriunda do estado da Bahia em 2015 (CHARLYS DA COSTA *et al.*, 2017); e, posteriormente, também foi identificado no estado de Alagoas, com constatações de que as cepas circulantes estavam relacionadas às cepas do genótipo ECSA da Bahia e de Sergipe (TANABE *et al.*, 2018). Casos autóctones de chikungunya em 2016 também foram relatados no estado do Rio Grande do Sul (GREGIANINI *et al.*, 2017). Além do genótipo Asiático presente na região amazônica do Brasil, houve também a introdução e o estabelecimento do genótipo ECSA em Boa

Vista/Roraima, a partir da região Nordeste do Brasil, onde foi observada a substituição do genótipo Asiático pelo genótipo ECSA naquela região (NAVECA *et al.*, 2018).

Em 2015 houve 43.253 notificações de infecções por CHIKV, um número expressivamente maior quando comparado ao ano de 2014. As notificações referentes a 2014 e 2015 apresentaram maior proporção nos estados do Nordeste (39.851 casos notificados), representando 83,3% dos registros do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), com confirmação de 14.033 casos (29, 3%) (SILVA *et al.*, 2018). Em 2016 observou-se um aumento significativo dos casos notificados, com o registro de 277.882 casos prováveis (BRASIL, 2018), prevalecendo o maior número de notificações nos estados do Ceará e Pernambuco (SILVA *et al.*, 2018). Foram registrados, em 2017, 185.593 casos prováveis, com a região Nordeste apresentando o maior número (142.074 casos; 76,6%) em relação ao total do país (BRASIL, 2018). Em 2018, o país registrou 87.687 casos prováveis, dos quais 52.966 (60,4%) ocorreram apenas na região Sudeste (BRASIL, 2019). Em 2020, até a semana 38, foram notificados 71.698 casos prováveis (taxa de incidência de 30 casos/ 100 mil habitantes) no país. As regiões Nordeste e Sudeste apresentaram as maiores taxas de incidência, 87,7 e 12,5 casos/100 mil habitantes, respectivamente (BRASIL, 2020).

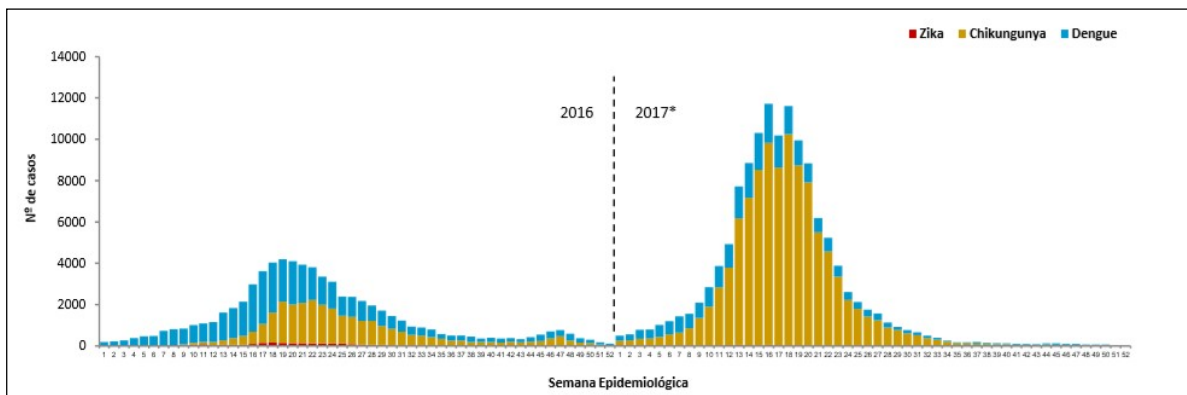
### **1.9.3 Chikungunya no Ceará**

No Ceará, os primeiros casos importados de chikungunya foram registrados em 2014 e início de 2015. A ocorrência de casos autóctones no Ceará deu-se em novembro do ano de 2015, com a confirmação de um caso residente de São Gonçalo do Amarante, município do principal complexo portuário do estado (Pecém). O segundo caso autóctone ocorreu em Fortaleza, em dezembro de 2015, e foi associado ao contato com caso confirmado laboratorialmente importado de Pernambuco (SIMIÃO *et al.*, 2019).

Em 2016, houve transmissão sustentada do CHIKV no Ceará, caracterizando um cenário epidêmico, com 49.516 casos suspeitos, sendo que 63,6% (31.482/49.516) foram confirmados, e estavam distribuídos em 80,8% dos municípios (139/172) (CEARÁ, 2016). No ano de 2017, a partir de fevereiro, observou-se uma elevação massiva de casos de chikungunya, em comparação às demais arboviroses, assim como em relação ao número de casos no mesmo período de 2016, caracterizando um cenário epidêmico no Ceará (CEARÁ, 2017) (Figura 11). Nesse período, foram encaminhadas ao Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Ceará (LACEN/CE), por intermédio das unidades de saúde de Fortaleza e de vários municípios do estado, 60.607 amostras de soro de casos suspeitos de chikungunya

para realização de diagnóstico laboratorial. Deste total, 41.329 (68,19%) foram confirmadas por sorologia IgM anti-CHIKV, de acordo com dados extraídos do sistema gerenciador de ambiente laboratorial (GAL).

Figura 11. Distribuição de casos confirmados de dengue, chikungunya e zika, por SE, Ceará, 2016 e 2017.



Fonte: Ceará, SESA, Boletim Epidemiológico SE 52, 2017.

Em 2018 houve uma redução acentuada nas taxas de incidência de chikungunya no Ceará, sendo notificados 5.217 casos suspeitos, dos quais 27% (1.413/5.217) foram confirmados e 70% (3.656/5217) descartados (CEARÁ, 2019a). No ano de 2019 dentre os 5.623 casos suspeitos notificados, 18,2% (1.026/5.623) foram confirmados e 74,4% (4.187/5.623) descartados (CEARÁ, 2019c). Já em 2020, até a Semana Epidemiológica 39, haviam sido notificados 3.185 casos suspeitos em 77,7% dos municípios cearenses (143/184), dos quais 20,8% (664/3.185) foram confirmados (CEARÁ, 2020).

### 1.10 Comitê e Serviço de Verificação de Óbitos

O Ministério da Saúde do Brasil, diante da ocorrência dos primeiros óbitos causados por infecções de CHIKV e ZIKV em 2015, adaptou os protocolos de investigação de óbitos até então exclusivos para dengue, também para estas duas outras arboviroses (CAVALCANTI *et al.*, 2019).

Diante do aumento no número de óbitos suspeitos de arbovírus, a Secretaria de Saúde do Estado do Ceará convocou um grupo de profissionais e criou um comitê multidisciplinar e interinstitucional de investigação de óbitos por arbovírus, mediante publicação da Portaria nº 2.099, de 29 de novembro de 2016. O grupo envolve especialistas das áreas de infectologia, epidemiologia, patologia, clínica médica, farmácia, enfermagem,

fisioterapia e biologia, lotados em setores como vigilância epidemiológica, assistência, unidade hospitalar de referência em doenças infecciosas, laboratório de Saúde Pública, universidades e Serviço de Verificação de Óbitos (CAVALCANTI *et al.*, 2019).

No estado do Ceará, os pacientes que vão a óbito sem diagnóstico definido e com suspeita de doença infecciosa, são encaminhados ao Serviço de Verificação de Óbitos Dr. Rocha Furtado (SVO), da Secretaria de Saúde do Estado (SESA-CE). Os cadáveres são submetidos à autópsia e os materiais biológicos como sangue, LCR e alíquotas de vísceras são coletados para posterior esclarecimento diagnóstico. As vísceras conservadas em formol são encaminhadas ao Instituto Evandro Chagas em Belém (IEC), para a realização do exame histopatológico e imunohistoquímica para arbovírus. O sangue, as vísceras *in natura* e o LCR, são encaminhados ao LACEN-CE para investigação laboratorial para arboviroses, leptospirose ou meningite, dependendo da suspeita clínica.

### **1.11 Relevância do estudo**

Nos últimos anos, a chikungunya vem chamando atenção devido à extensão dos surtos epidêmicos e às características clínicas diferenciadas, como maior gravidade, número de óbitos e casos atípicos, como os casos neurológicos, tornando-se um desafio tanto para profissionais de saúde, quanto para a população em geral, devido à similaridade de sinais e sintomas com dengue e zika, também presentes no nosso estado.

Dois dos três genótipos de CHIKV já foram reportados no Brasil: o Asiático e o ECSA (NUNES *et al.*, 2015). Mutações adaptativas em cepas pertencentes ao ECSA já foram descritas e associadas a uma maior transmissão pelo mosquito *Ae. albopictus* (VOLK *et al.*, 2010), vetor também encontrado no Brasil. No entanto, estas mutações não foram observadas nas cepas brasileiras pertencentes a este genótipo (SILVA *et al.*, 2018).

A capacidade do CHIKV de dispersar geograficamente ao redor do mundo está associada ao aparecimento de mutações espontâneas no genoma viral que podem resultar na adaptação do vírus a diferentes espécies de vetores (CHU; ANG, 2016). É notória a relevância para a saúde pública da implementação de um sistema de vigilância que monitore a difusão do vírus e o aparecimento de novas variantes genéticas (GARDY; LOMAN, 2017). Tal sistema pode ser alcançado através da implementação de métodos de sequenciamento que proporcionem uma melhora na sensibilidade e especificidade do diagnóstico, além da integração dos dados genômicos e epidemiológicos, com o objetivo de elucidar os padrões de dispersão do vírus durante uma epidemia (GRUBAUGH *et al.*, 2019).

Neste contexto, estudos de sequenciamento e filogenéticos podem representar uma importante ferramenta para monitorar a dispersão dos genótipos do CHIKV, identificar mutações e contribuir para o entendimento das possíveis consequências de tais eventos. Faz-se necessário a realização de estudos para um melhor entendimento e compreensão da chikungunya, com vigilância virológica constante e intervenções mais eficazes, contribuindo assim, para as tomadas de decisões na saúde pública.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Descrever características clínicas e epidemiológicas de casos fatais por chikungunya no Ceará em 2017, incluindo óbitos com envolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC), e o estudo genômico do CHIKV nesses óbitos.

### **2.2 Específicos**

- i. Realizar o diagnóstico laboratorial (sorologia, RT-qPCR) no LCR, sangue e tecido cerebral e a imunohistoquímica em vísceras de pacientes que foram a óbito com suspeita de infecção por arbovírus;
- ii. Descrever o quadro clínico e a sintomatologia de pacientes que foram a óbito por infecção por CHIKV;
- iii. Realizar o sequenciamento e a caracterização genômica do CHIKV de amostras de pacientes que foram a óbito por infecção por CHIKV com envolvimento do SNC;
- iv. Determinar o genótipo circulante de CHIKV e sua possível data de introdução no Ceará.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Tipo do estudo

Trata-se de um estudo observacional, transversal, descritivo e quantitativo.

#### 3.2 População de estudo

Este estudo incluiu pacientes que foram a óbito, com suspeita clínica de infecção por arbovírus, notificados pelo Serviço de Verificação de Óbito (SVO) da Secretaria Estadual de Saúde do Ceará, entre dezembro de 2016 e outubro de 2017. As amostras de sangue, líquido cefalorraquidiano (LCR) e tecidos (cérebro, baço, rim, coração, pulmão) foram coletadas e encaminhadas para o Setor de Virologia do Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará (LACEN/CE). Em seguida, as amostras biológicas *in natura* foram armazenadas em *ultrafreezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$  para investigação subsequente. Também, os tecidos coletados e conservados em formol a 10% foram enviados ao Instituto Evandro Chagas (IEC), Belém/Pará.

#### 3.3 Definição de caso

Um caso fatal de suspeita de infecção pelo CHIKV foi definido como um paciente que apresentou febre, erupção cutânea, dor de cabeça por artralgia e/ou mialgia durante o período de hospitalização ou no *perimortem*. Uma morte confirmada por CHIKV foi definida como um caso fatal suspeito de infecção por CHIKV, mais um resultado laboratorial positivo para CHIKV por método molecular de reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcriptase reversa (RT-qPCR), e/ou detecção de imunoglobulina M (IgM) e / ou imunohistoquímica (IHC). Além disso, foi definido um desfecho fatal agudo como um caso que durou até 20 dias, representando a doença aguda; e um resultado fatal pós-agudo, como um caso que durou mais de 20 dias a 90 dias. Pacientes com manifestações neurológicas (como confusão e síncope) e detecção de RT-qPCR ou IgM contra CHIKV no LCR foram considerados portadores de infecção no SNC causada por CHIKV.



### **3.4 Comitê de Ética**

O estudo realizado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, sob o parecer de nº 2.583.257 e CAAE 85921418.3.0000.5054, seguindo as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa em Seres Humanos estabelecidas na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS (ANEXO 1).

### **3.5 Diagnóstico laboratorial**

Todas as amostras foram submetidas ao diagnóstico laboratorial para arbovírus circulantes na região. Os testes sorológicos para detecção de imunoglobulinas IgM de DENV, CHIKV e ZIKV e antígeno NS1 de DENV foram realizados no Laboratório de Exantemática, e a detecção do vírus por RT-qPCR de DENV, CHIKV e ZIKV foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular, ambos no Setor de Virologia do LACEN/CE. A imunohistoquímica foi realizada no Instituto Evandro Chagas (IEC), Belém/Pará.

#### ***3.5.1 Testes sorológicos***

As amostras de soro e LCR coletadas no *post mortem* foram testadas por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para DENV, ZIKV e CHIKV. Para isso, utilizamos ELISAs de captura de IgM contra CHIKV (Euroimmun, Alemanha), IgM contra DENV (Serion, Alemanha) e IgM contra ZIKV (NovaTec Immundiagnostica GmbH, Alemanha). Também foi utilizado o ELISA para antígenos DENV-NS1 (Bio-Rad Laboratories, EUA).

#### ***3.5.2 Extração do RNA viral***

O RNA viral das amostras séricas e LCR foi extraído usando os kits QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, EUA), enquanto as amostras de tecido cerebral foram extraídas com o kit ReliaPrep™ RNA Miniprep Systems (Promega, EUA), sempre seguindo as recomendações do fabricante. Em ambas as extrações, o RNA foi eluído com 50 µL de tampão de eluição e armazenado a -80°C até a análise do teste.

### 3.5.3 Diagnóstico de arbovírus por RT-qPCR em tempo real

O RNA extraído foi testado por RT-qPCR em tempo real, utilizando iniciadores (*primers*) e sondas específicas (Tabela 3) para detecção do genoma de CHIKV, DENV e ZIKV de acordo com protocolos previamente descritos (LANCIOTTI *et al.*, 2007; JOHNSON *et al.*, 2005; LANCIOTTI *et al.*, 2008). O kit de RT-qPCR utilizado foi o GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System, Custom (PROMEGA, EUA). Todas as reações foram conduzidas no equipamento da Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA).

Tabela 3. Oligonucleotídeos específicos utilizados para a RT-qPCR de DENV, CHIKV e ZIKV.

CHIKV		Sequência
Primer874F	(5''-3'')	AAA GGG CAAACT CAG CTT CAC
Primer961R	(5'-3')	GCC TGG GCT CAT CGT TAT TC
Sonda		6FAMCGC TGT GAT ACA GTG GTT TCG TGT
DENV-1		Sequência
Primer 1F	5' d	CAAAAGGAAGTCGYGCAATA 3'
Primer 1R	5' d	CTGAGTGAATTCTCTCTGCTRAAC 3'
Sonda	5' d	FAM-CATGTGGYTGGGAGCRCGC-BHQ-1 3'
DENV-2		Sequência
Primer 2F	5' d	CAGGCTATGGCACYGTCACGAT 3'
Primer 2R	5' d	CCATYTG CAGCARCACCATCTC 3'
Sonda	5' d	HEX-CTCYCCRAGAACGGGCCTCGACTTCAA-BHQ-1 3'
DENV-3		Sequência
Primer 3F	5' d	GGACTRGACACACGCACCCA 3'
Primer 3R	5' d	CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGYCT 3'
Sonda	5' d	CAL Flour Red 610-ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG-BHQ-2 3'
DENV-4		Sequência
Primer 4F	5' d	TTGTCCTAATGATGCTRGTCG 3'
Primer 4R	5' d	TCCACCYGAGACTCCTTCCA 3'
Sonda	5' d	Quasar 670-TYCCTACYCCTACGCATCGCATTCCG-BHQ-2 3'
ZIKV		Sequência
Primer9271F	5' d	AARTACACATACCARAACAAAGTGGT 3'
Primer9373R	5' d	TCCRCTCCCYCTYTGGTCTTG 3'
Sonda 9304S	5'-/ 56-FAM /	CTY AGA CCA +G+C+T+GAA R / 3IABkFQ / -3'

Fonte: BRASIL. CGLAB, 2017.

### 3.5.4 Imunohistoquímica

Foi utilizada a técnica de IHQ indireta, que está associada ao complexo avidina-biotina-enzima, formado pela ligação de uma molécula de avidina com várias de biotina associadas a uma peroxidase ou uma fosfatase alcalina. A visualização é possível porque a reação química permite a conversão de um cromógeno incolor, em um produto final que confere cor aos antígenos teciduais marcados. A IHQ das amostras de tecidos hepático e cerebral de todos os pacientes do estudo foi realizada no Instituto Evandro Chagas (IEC).

### 3.6 Sequenciamento genômico completo do CHIKV na plataforma MinION

Um conjunto de amostras séricas e LCR positivas para CHIKV foram sequenciadas na plataforma MinION (Oxford Nanopore, Reino Unido), conforme protocolo previamente publicado (QUICK *et al.*, 2017). Em resumo, a partir do RNA extraído realizou-se a síntese de cDNA por meio de transcrição reversa com o sistema *Protoscript II First Strand cDNA synthesis Kit* (New England Biolabs, Reino Unido) e uso de iniciadores randômicos seguindo instruções fornecidas pelo fabricante. Em seguida, foi realizada uma reação de PCR *multiplex* com um conjunto de iniciadores específicos para CHIKV utilizando enzima *Q5 High-Fidelity DNA polymerase* (New England Biolabs, Reino Unido) com o objetivo de amplificar o genoma completo das amostras positivas para CHIKV. Para melhorar a cobertura do sequenciamento consenso, foram selecionadas 36 linhagens genômicas completas disponíveis ao público, as quais foram usadas como moldes para redesenhar os iniciadores específicos de sequenciamento do CHIKV, ajustando-se ao genótipo identificado em execuções preliminares, corrigindo possíveis incompatibilidades.

Os produtos de PCR foram purificados com *AmpureXP purification beads* (Beckman Coulter, Reino Unido) e quantificados por fluorimetria com o *kit Qubit dsDNA High Sensitivity* no Qubit 4.0 (Life Technologies, EUA). Em seguida realizou-se a ligação do material genômico alvo com sequências conhecidas contendo códigos de barras (*barcodes*) utilizando o *kit Native Barcoding Kit* (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido). Por fim, as amostras foram sequenciadas na plataforma MinION usando células de fluxo do tipo *R9.4* (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido). As sequências genômicas consenso foram geradas pelo alinhamento das leituras com um genoma de referência de CHIKV, e com uma cobertura mínima de 20 vezes do genoma, utilizando protocolo de bioinformática previamente descrito (QUICK *et al.*, 2017).

### 3.7 Estudo filogenético do CHIKV no Ceará

Para estimar o período da introdução do CHIKV no Ceará, bem como elucidar o padrão de dispersão do vírus no estado, foi realizado um estudo filogenético, cujas análises podem gerar estimativas, tal como um relógio molecular baseado na diversidade das sequências de nucleotídeos das variantes estudadas.

#### 3.7.1 Conjuntos de dados do CHIKV

As sequências genômicas do CHIKV dos casos fatais no Ceará foram agrupadas com 87 sequências genômicas completas de CHIKV do Brasil que estavam disponíveis no *GenBank*. Em seguida, o conjunto de dados foi alinhado com o programa *MAFFT* versão 7.450 (KATO, MISAWA, KUMA, MIYATA, 2002). Depois, foi determinado o melhor modelo de substituição para análises filogenéticas em nucleotídeos com os programas *jModelTest 2* (STAMATAKIS, 2014).

#### 3.7.2 Análises filogenéticas de máxima verossimilhança

Para elucidar os processos evolutivos do CHIKV no Ceará, testes de filogenia foram realizados por meio de abordagem de máxima verossimilhança (ML - *Maximum likelihood*) usando o pacote de análises *RAxML* versão 8 com o modelo de substituição de nucleotídeos determinado pelo *jModelTest2* (STAMATAKIS, 2014). Os suportes estatísticos das árvores filogenéticas foram calculados através de *bootstrap* com 1000 réplicas. Em resumo, as datas de coleta no formato aaaa-mm-dd (norma ISO 8601) foram correlacionadas de acordo com as distâncias genéticas obtidas na filogenia de ML.

#### 3.7.3 História espaço-temporal e demográfica do CHIKV no Ceará

A análise do relógio molecular *bayesiano* usando uma estrutura de *bayesiana* flexível foi realizada no programa *BEAST* v.1.10.1 (SUCHARD, 2018). Para determinar a inferência cronológica, a dispersão espacial e a dinâmica populacional dos vírus no estado do Ceará e região nordeste do Brasil, o modelo de relógio molecular (*strict*) foi combinado com modelos de coalescência *Bayesianos* com função *Skygrid* (GILL, 2013). Assim, esta análise estatística possibilitou inferir o provável período da introdução do CHIKV no Ceará. As

análises evolutivas foram executadas independentemente, em duplicata, por 50 milhões de etapas, e foram geradas 10.000 réplicas das árvores filogenéticas. A árvore filogenética final foi obtida com o TreeAnnotator v.1.10 (SUCHARD, 2018).

### **3.7.4 Disponibilidade de dados**

Os protocolos e os novos iniciadores para sequenciamento estão disponíveis publicamente em [caddecentre.org/protocols](http://caddecentre.org/protocols). Dados epidemiológicos, árvores filogenéticas, XMLs e sequências do genoma do CHIKV do Ceará estão disponíveis no repositório DRYAD (disponível em [https://datadryad.org/stash/share/y0poMC\\_pufbi2DEAelhcOdJDOjFYlud\\_D5s56VfMC8](https://datadryad.org/stash/share/y0poMC_pufbi2DEAelhcOdJDOjFYlud_D5s56VfMC8)). Novas sequências foram depositadas no GenBank com números de acesso MT877206-MT877211.

### **3.8 Análises estatísticas**

As análises descritivas dos resultados foram apresentadas como frequências, médias aritméticas e intervalos (quando apropriado). O teste U de Mann-Whitney foi realizado no RStudio 1.2.1335 ([www.rstudio.com](http://www.rstudio.com)) comparando os grupos com comorbidades. Para a análise de regressão, a variável do desfecho foi classificada como pacientes com desfecho fatal durante a fase aguda ou pós-aguda da doença. As comorbidades mais frequentes foram utilizadas para análise estatística. Para determinar as comorbidades que podem afetar a frequência de morte durante a fase aguda ou pós-aguda da doença, foi realizada uma análise de regressão logística univariada, seguida por uma regressão logística multivariada controlando sexo e idade. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos. As análises estatísticas foram realizadas com o Stata v.14 (StataCorp, EUA).

### **3.9 Dados epidemiológicos**

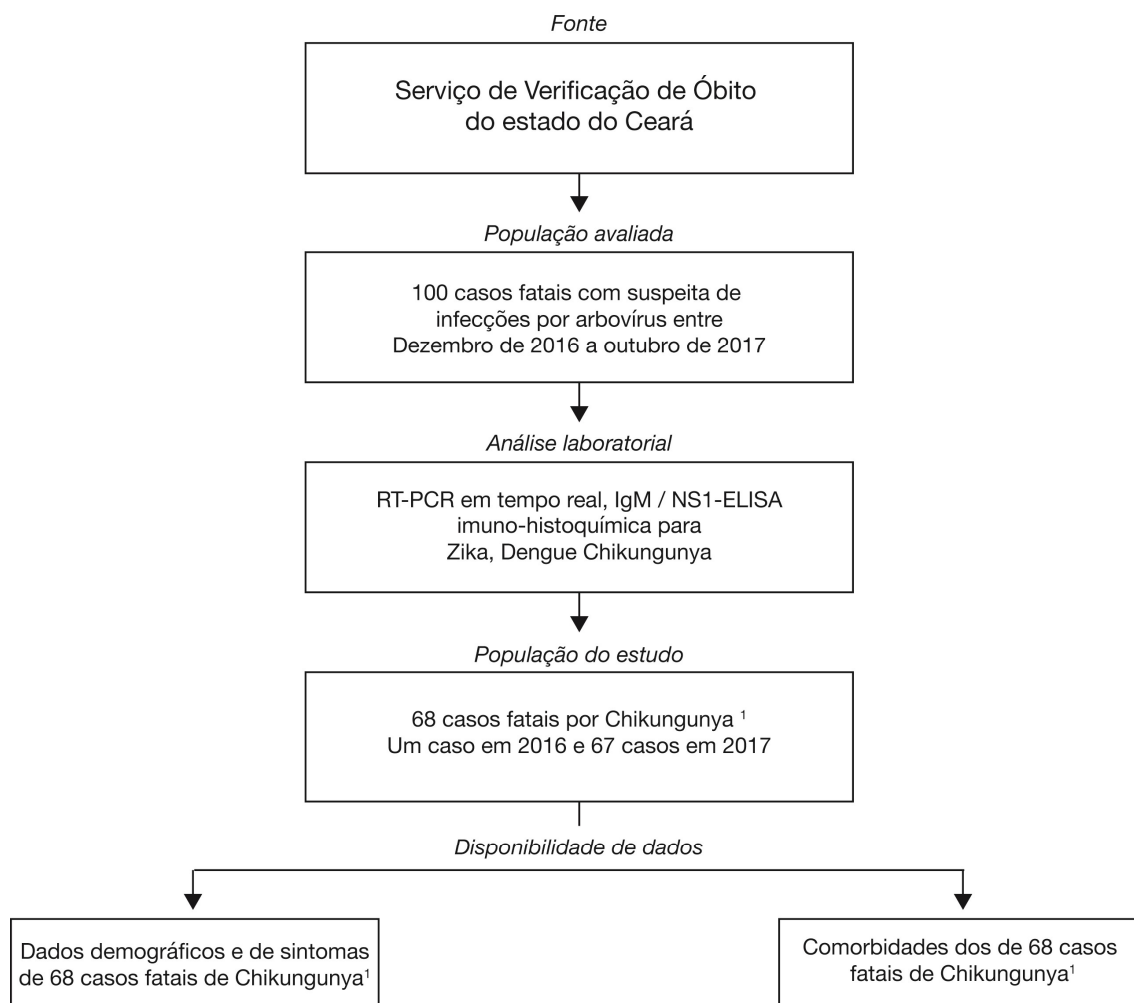
A análise epidemiológica dos casos autóctones de CHIKV no Ceará foi realizada de janeiro a dezembro de 2017, por meio de dados obtidos pelo diagnóstico laboratorial, no sistema de gestão do laboratório (GAL - Gerenciador de Ambiente Laboratorial), do SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação, e de relatórios semanais de casos suspeitos. Os relatórios epidemiológicos dos casos foram obtidos no Ministério da Saúde ([www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)). As incidências foram calculadas com base na população estimada do

estado do Ceará em 2017, conforme reportado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística ([www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)).

## 4 RESULTADOS

Entre dezembro de 2016 e outubro de 2017, o SVO notificou e coletou amostras de sangue, líquido e vísceras de 127 pacientes suspeitos de óbito por arboviroses, e encaminhou o material para o Setor de Virologia do LACEN/CE. Neste estudo foram incluídos 100 pacientes que evoluíram para óbito (casos fatais) e que tinham amostras séricas e LCR disponíveis. (Figura 12)

Figura 12. Fluxograma e desenho do estudo.



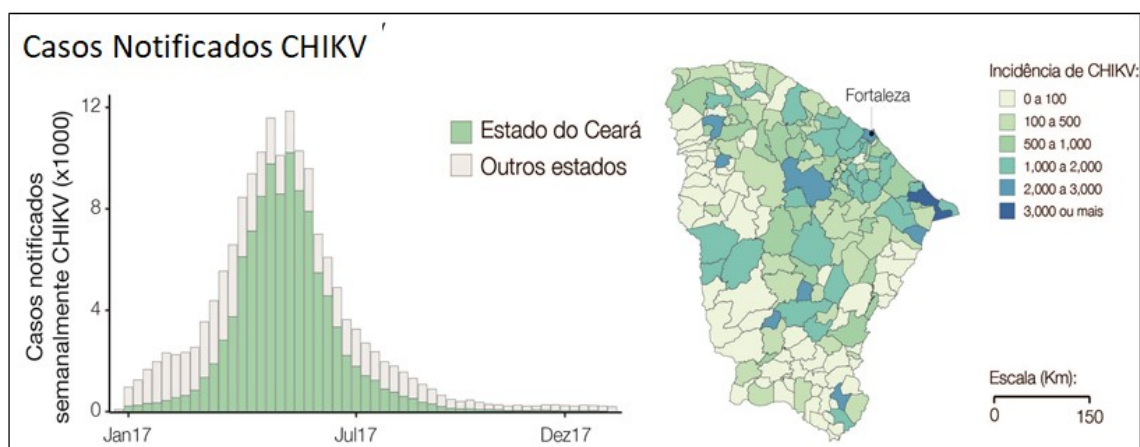
Fonte: Dados do estudo.





as mortes por CHIKV seguiram uma distribuição temporal semelhante à dos casos notificados no Ceará, com a maioria dos casos relatados em Fortaleza (Figura 14).

Figura 14. Notificação de chikungunya. Curva de casos notificados por semana epidemiológica no Ceará e em outros estados brasileiros, e incidência nos municípios no Ceará em 2017.



Fonte: Dados da pesquisa.

As características epidemiológicas e clínicas dos 68 óbitos confirmados por CHIK estão apresentados na Figura 15. Os óbitos por CHIK ocorreram predominantemente em adultos com idade acima de 40 anos (63,2%,  $n = 43/68$ ), sendo 30,9% (21/68) em adultos com idade entre 41 e 64 anos, e 32,3% (22/68) com 65 anos ou mais. A idade média foi de 47,6 anos (mediana = 51 anos), variando de 3 dias a 85 anos. A maioria das mortes por CHIK ocorreu em mulheres (55,9%,  $n = 38/68$ ), e também foram relatadas cinco mortes por CHIK que ocorreram em crianças menores de 1 ano e cinco em crianças de 1 a 12 anos (Figura 15A).

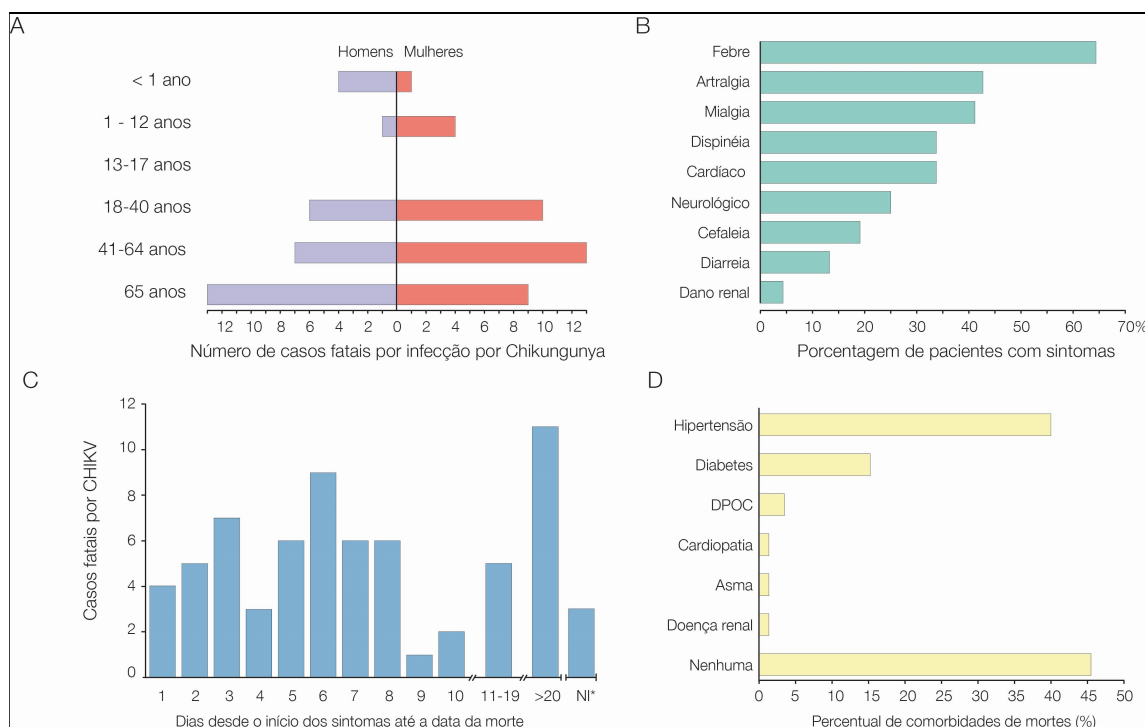
As manifestações clínicas gerais apresentadas pelos pacientes que vieram a óbito por chikungunya foram: febre (64,7%,  $n=44/68$ ), artralgia (43,3%,  $n=29/67$ ), sintomas cardíacos, incluído parada cardíaca (34,3%,  $n=23/67$ ), dispneia (33,8%,  $n=23/68$ ), diarreia (33,8%,  $n=23/68$ ), sintomas neurológicos como confusão e síncope (25,4%,  $n=17/67$ ), dor de cabeça (19,1%,  $n=13/68$ ) e insuficiência renal (5,9%,  $n=4/68$ ) (Figura 15B).

Foi observado um tempo médio de 12 dias (intervalo: 1-90 dias) entre o início dos sintomas e o óbito. Não foi possível obter informações sobre a data de início dos sintomas em três pacientes (4,4%). Das 68 mortes por CHIK, 79,4% (54/68) ocorreram em pacientes com infecção na fase aguda, com o óbito ocorrendo em até 18 dias após o início dos sintomas. Por

outro lado, 16,2% (11/68) dos casos fatais ocorreram em pacientes com infecção na fase pós-aguda (20 a 90 dias), como apresentado na Figura 15C.

Para a análise de comorbidades e de imunossupressão foram analisados os registros médicos disponíveis, dos pacientes que vieram a óbito por chikungunya (65%, 44/68). Não foram encontradas comorbidades em 45,5% dos prontuários (20/44), enquanto 29,5% (13/44) apresentaram uma comorbidade, 18,2% (8/44) apresentaram duas comorbidades e apenas 2,3% (1/44) possuíam três comorbidades. As comorbidades mais frequentes foram hipertensão em 40,9% (18/44), e diabetes em 15,9% (7/44). (Figura 15D)

Figura 15. Informações epidemiológicas, sinais/sintomas e comorbidades dos 68 casos fatais por CHIKV no Ceará, Brasil. (A) Faixa etária e sexo. (B) Características clínicas. (C) Início dos sintomas dos indivíduos até a morte. (D) Comorbidades associadas dos casos fatais por CHIKV.



Fonte: Dados da pesquisa.

A idade média dos pacientes que foram a óbito por chikungunya com comorbidades foi de 60 anos (de 31 a 85 anos), diferindo da idade média daqueles sem comorbidades (37,4 anos, 3 dias a 79 anos) ( $p=0,003$ , teste U de Mann-Whitney). A análise de regressão logística multivariada, controlada por idade e sexo, sugere que o risco de morte durante a fase pós-aguda da infecção pelo CHIKV aumenta sete vezes nos casos com diabetes quando comparado aos casos sem diabetes, razão de chances: 7,7,  $p = 0,033$  (Tabelas 4 e 5).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os dias de óbito de pacientes com e sem comorbidades ( $p = 0,2855$ , teste U de Mann-Whitney). Na população estudada, não foram encontrados relatos de pacientes fatais de chikungunya com imunossupressão por tratamento com câncer, HIV ou tratamento com corticoides.

Tabela 4. Análise de regressão logística univariada e multivariada de fatalidades na fase pós-aguda por infecção por chikungunya.

Sintomas	Fatalidade de risco durante doença pós-aguda					
	Não ajustado OR*	IC95%	Valor de	$\phi$ ajustado OR *	IC 95%	Valor de $p$
<b>Hipertensão</b>						
Não	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
Sim	2.77	0.58 - 13.2	0.200	4.1	0.62-26.9	0.141
<b>Diabetes</b>						
Não	Ref.	Ref.	Ref.	Ref	Ref	Ref.
Sim	6.93	1.2 - 40.9	<b>0.033</b>	<b>7.7</b>	1.2 - 50.0	<b>0.033</b>
<b>Diabetes and hipertensão</b>						
Não	Ref.	Ref	Ref	Ref.	Ref.	Ref.
Sim	1.50	0.20-10-8	0.687	2.48	0.20-29.4	0.472

\*OR = probabilidades  $\phi$  ajustes por: Sexo OR = 0.96,  $p= 0.966$ ; Idade OR= 1.00,  $p=9.66$

Tabela 5. Demografia e comorbidades dos casos fatais de CHIK (n = 68)

Características	N (%)
<b>Sexo</b>	
Feminino	38 (55,9)
Masculino	30 (44,1)
<b>Idade*</b>	47,7 ± 24,5
<b>Estagio da doença até morte (n=68)</b>	
Agudo (0-20 dias)	54 (79,4)
Pós-agudo (>20 dias)	11 (16,2)
Sem informação	3 (4,4)
<b>Hipertensão (n=41)</b>	
Sim	19 (46,3)
Não	22 (53,7)
<b>Doença cardíaca (n=39)</b>	
Sim	1 (2,6)
Não	32 (97,4)
<b>DPOC (n=39)</b>	
Sim	2 (5,1)
Não	37 (94,9)
<b>Asma (n=38)</b>	
Sim	1 (2,6)
Não	37 (97,4)
<b>Lesão renal (n=39)</b>	
Sim	1 (2,6)
Não	38 (97,4)
<b>Hipertensão e diabetes</b>	
Sim	10 (31,2)
Não	22 (68,8)

\* Média ± desvio padrão

Para elucidar a diversidade genética do CHIKV no Ceará, foi sequenciado o genoma viral de sete amostras recuperadas de seis casos fatais de chikungunya (amostras de LCR dos pacientes 8, 12, 22 e 27; amostra sérica do paciente 59; e amostra sérica e de LCR do paciente 4). As análises filogenéticas (ML e Bayesiana) sugeriram que as cepas CHIKV circulantes no Ceará formam dois clados monofiléticos (1 e 2), que agrupam-se dentro da linhagem ECSA que circula no Brasil (*bootstrap* = 100, suporte posterior = 1,00). As análises sugerem que o

CHIKV foi introduzido no Ceará entre o início de 2015 e meados de 2016, com o ancestral mais comum para cada grupo por volta de meados de 2016 (clado 1 = 2016.60, 95% HPD 2016.39 - 2016.90; clado 2 = 2016.84, 96% HPD, 2015.5-2016.83) (Figura 16). Comparando os genomas de CHIKV do Ceará, gerados por esse estudo, com os genomas de CHIKV disponíveis, não foram encontradas mutações que poderiam estar associadas ao aumento da infecção e transmissão em mosquitos e/ou aumento da virulência.

Figura 16. Árvore filogenética do genótipo CHIKV-ECSA no Brasil (n = 71), incluindo 6 novas seqüências do Ceará.

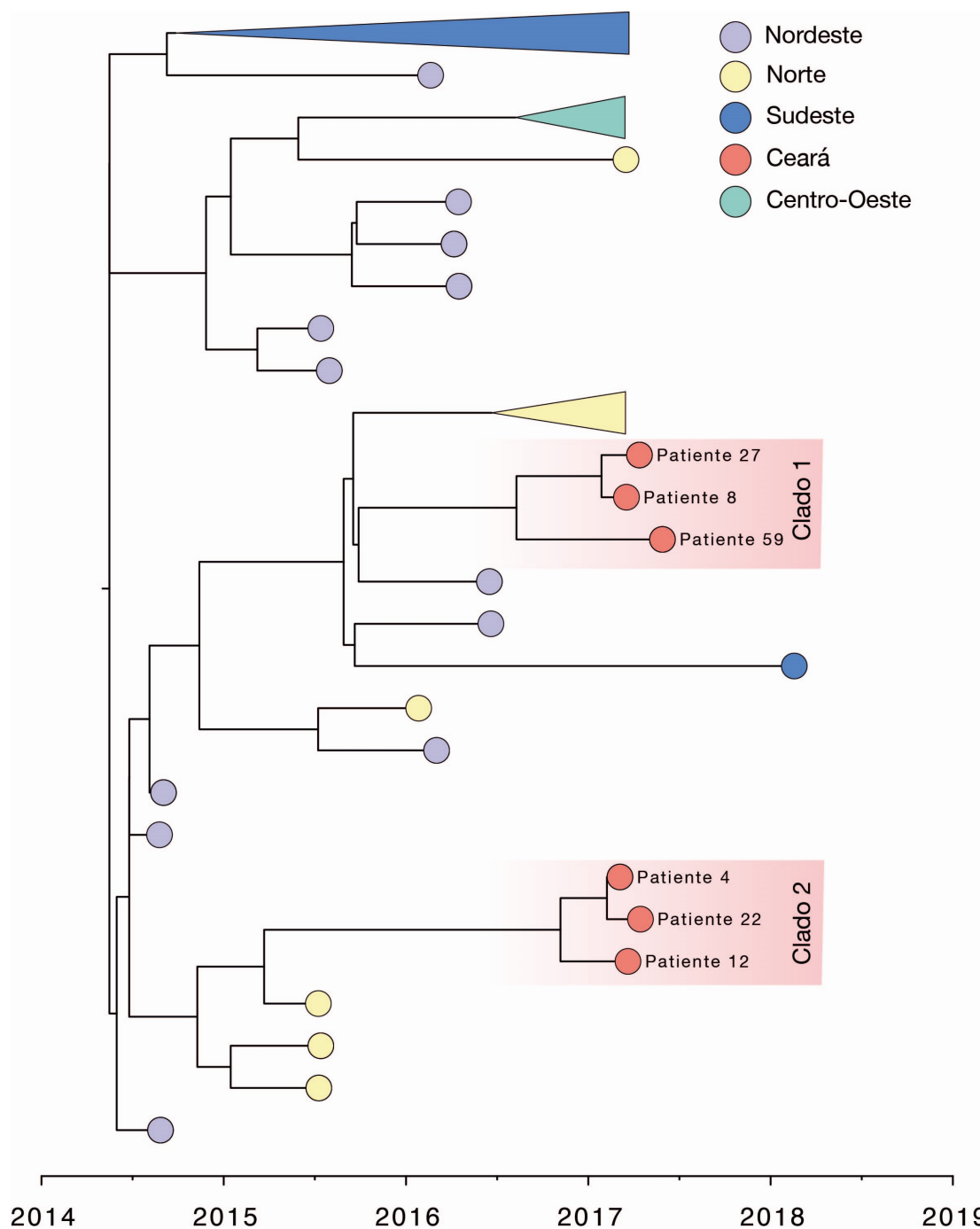


Figura 16. Árvore filogenética do genótipo ECSA de CHIKV no Brasil (n = 71), incluindo 6 novas seqüências do Ceará. Os taxons foram coloridos de acordo com a região de origem de cada amostra. Os grupos das regiões Sudeste, Centro-Oeste e Norte foram suprimidos para melhor visualização. Os dois grupos de seqüências deste estudo foram identificados como Clado 1 e Clado 2, e estimado o *TMRCAs* mais antigo para cada clado.

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi realizada uma caracterização abrangente com descrição de achados clínicos, demográficos e laboratoriais do maior estudo transversal de casos fatais confirmados por infecção pelo CHIKV. Também foi evidenciada a correlação do CHIKV com infecção no SNC e a presença do genótipo ECSA na epidemia de 2017 no Ceará.

As análises epidemiológicas mostraram que, em 2017, o Ceará teve a maior epidemia de chikungunya do Brasil, com 65,7% (n=105.229 de 160.166) de todos os casos suspeitos nos 27 estados federais brasileiros. No referido ano, a incidência de chikungunya no Ceará foi de 1.166 casos suspeitos por 100.000 habitantes, a maior do país (BRASIL, 2017a). Entre os municípios afetados, destaca-se Fortaleza, a capital do estado, com a maioria dos casos de chikungunya (58,8%, n = 61.825 de 105.229). Em 2017, o Ceará notificou 194 mortes relacionadas ao chikungunya (SIMIAO *et al.*, 2019), correspondendo a uma taxa de letalidade de 1,8 óbitos por 1.000 casos. Fortaleza também foi o local que registrou o maior número de óbitos relacionados à infecção pelo CHIKV (74,2%, n = 144/194) (CEARÁ, 2018).

Foi confirmada a infecção pelo chikungunya em 68 casos dentre os 100 óbitos analisados nesse estudo. A detecção de RNA-CHIKV e anticorpos IgM específicos contra CHIKV no LCR, soro e tecido cerebral destes pacientes, durante o grande surto de CHIKV, além da ausência de ácido nucleico de outros arbovírus nestas amostras, fornecem evidências convincentes de que o CHIKV foi a causa dessas mortes. Embora o estado do Ceará seja endêmico para DENV e ZIKV com desfechos fatais descritos por esses vírus, como relatado por Araújo *et al.* (2012) e Sousa *et al.* (2017), respectivamente, RNA de DENV e ZIKV não foi encontrado nas amostras biológicas dos casos fatais descritos neste estudo. Anti-IgM de CHIKV foi o único anticorpo detectado em 73,5% dos pacientes (50/68), excluindo a codetecção com Zika e Dengue.

Após a grande epidemia de chikungunya na Ilha Reunião, localizada na região sudoeste do Oceano Índico, em 2005/2006, os estudos locais e internacionais dessa patologia aumentaram significativamente (RENAULT *et al.*, 2007). Mesmo assim, o CHIKV causou inúmeras epidemias na África, Índia e sudeste da Ásia que envolveram milhares de pessoas (BORGHERINI *et al.*, 2007). Desde 2013, o CHIKV causou mais de 2,5 milhões de casos relatados em 51 países nas Américas, causando 631 mortes (PAHO/WHO PAHO, 2019).

Apesar de diversos estudos sobre chikungunya, as informações sobre casos fatais são escassas. Casolare *et al.* (2008) descreveram um caso fatal de um homem de 83 anos

hospitalizado por encefalite, no nordeste da Itália. Após estudos, foi detectado por PCR, o genoma do CHIKV no LCR e sangue do paciente, levando os autores à conclusão de que o CHIKV pode afetar o SNC, causando encefalite grave em indivíduos com idade avançada e doença de base. Hoz *et al.* (2015), descreveram três pacientes com infecção por CHIKV que apresentaram falência de múltiplos órgãos e morreram dentro de 24 horas após admissão em um hospital da Colômbia. Em 2018, na Índia, Khatri *et al.* reportaram um caso de um homem de 64 anos diagnosticado com encefalomielite por CHIKV, confirmados por exames sorológicos e de PCR, concluindo o diagnóstico com a clínica e imagens radiológicas. De Lima *et al.* (2020) relataram o caso de um homem de 57 anos atendido e internado em um hospital do nordeste do Brasil. Após confirmação laboratorial da presença de anticorpos anti-CHIKV no LCR e soro do paciente, assim como exames de imagens, o paciente foi diagnosticado com encefalite causada por CHIKV, vindo a óbito após 24 dias de internação.

O ELISA Anti-IgM é um ensaio relativamente sensível e específico para diagnóstico laboratorial de chikungunya (WEAVER & LECUIT, 2015). Porém, como os testes sorológicos não são desenvolvidos especificamente para cada um dos complexos antigênicos das famílias virais, as imunoglobulinas IgM podem reagir dentro de sorogrupos causando reações cruzadas e resultados falso-positivos (CHARREL, 2016). Apesar disso, embora o ELISA para IgM do chikungunya possa apresentar reação cruzada com imunoglobulinas de outras espécies de alfavírus (por exemplo, Mayaro, Ross River, O'nyong nyong), os resultados sorológicos deste estudo reforçam que os casos fatais ocorridos no Ceará foram por chikungunya, especialmente por não haver relato de circulação de outros alfavírus no estado do Ceará no período estudado.

A detecção de RNA-CHIKV no LCR de 36 pacientes, incluindo 4 amostras de tecidos cerebrais positivos para o genoma de CHIKV, associado aos sintomas neurológicos mais relatados nesse estudo (como confusão e síncope) são fortemente indicativos do papel neurotrópico do CHIKV em uma doença do SNC, confirmando sua capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica. Além disso, a detecção de RNA-CHIKV no LCR pode ser útil para o diagnóstico em uma forma neuroinvasiva de febre chikungunya.

A partir da avaliação das características epidemiológicas dos 68 casos fatais desde estudo, evidenciamos a predominância do sexo feminino, com 55,9% dos casos. Nos dados do Boletim Epidemiológico da Secretaria de Saúde do Ceará, de 03/04/2018, referente à epidemia de 2017, o número de notificações confirmadas foi do sexo feminino, embora no número de óbitos o predomínio tenha sido do sexo masculino, com 53,1% dos casos. No estudo de Joshi *et al.* (2020), os casos confirmados, na sua maioria foram homens, embora



não tenha havido diferença significativa em relação a mulheres, assim como no estudo de Sá *et al.*, 2017, cuja ocorrência de casos fatais foi proporcional (50%) em ambos os sexos. Garay-Morán *et al.*, 2017 relataram predomínio do sexo feminino (64%) no estudo realizado por eles no México. Em Kerala, na Índia, Kumar *et al.*, 2011, constataram que o maior número de afetados no estudo realizado por eles, foi do sexo masculino. A epidemia relatada na Ilha Reunião em 2005/2006 afetou ambos os sexos, sem diferenças estatisticamente significantes (RENAULT *et al.*, 2007).

A infecção grave por CHIKV tem sido diretamente correlacionada com a idade, e segue uma curva parabólica em forma de “U”, como descrito por Weaver & Lecuit (2015). Os resultados obtidos neste estudo confirmam que adultos de meia idade e idosos constituíram a maioria das mortes por CHIKV, seguidos pelos casos pediátricos. Não foram identificados casos fatais em adolescentes. Das mortes por CHIKV 23,5% ocorreram em adultos jovens e 38,2% (26/68) em pessoas com idade inferior a 40 anos, indicando que as mortes por infecção por CHIKV ocorrem em pacientes mais jovens do que o anteriormente descrito. Nos estudos de Cerny *et al.* (2017), cinquenta por cento dos casos ocorreram em pacientes mais jovens (<45 anos) sem comorbidade relatada. Portanto, estudos clínicos e epidemiológicos futuros do CHIKV podem ajudar a esclarecer o risco de infecção e gravidade da doença por faixa etária.

As comorbidades e a idade avançada tem um papel importante nas mortes por chikungunya. Pacientes com comorbidades ou imunocomprometidos são considerados os principais grupos de risco associados à infecção grave por CHIKV, segundo o estudo de Weaver & Lecuit, 2015. Os dados obtidos neste estudo corroboram, em parte, com essa conclusão, pois 54,5% dos casos estudados apresentavam pelo menos uma comorbidade. Notavelmente, foi observado que a presença de diabetes aumenta consideravelmente o risco de morte entre pacientes na fase pós-aguda da infecção pelo CHIKV. Sissoko *et al.* (2009) e Renault *et al.*(2007) , relataram que o surto de chikungunya na Ilha da Reunião revelou características desconhecidas da doença, como artralgia persistente por mais de 15 meses (com implicações críticas na qualidade de vida) e alta letalidade entre pacientes idosos com doenças preexistentes, como hipertensão e diabetes. Também foi constatado neste estudo que o diabetes e a hipertensão são as comorbidades mais frequentes dentre os 68 óbitos por chikungunya aqui estudados. No entanto, 45,5% dos pacientes não apresentaram comorbidade relatada em seus prontuários. Além disso, nenhum dos casos possuía histórico médico de imunossupressão. Coletivamente, esses resultados sugerem que a infecção por CHIKV pode levar à morte do paciente, mesmo na ausência de uma condição médica subjacente. Sá *et al.*

(2017) afirmam em seu estudo que as manifestações neurológicas são complicações com risco de vida em pacientes infectados com CHIKV, mesmo naqueles sem qualquer comorbidade.

A infecção pelo CHIKV é sintomática na maioria dos indivíduos, manifestando-se como uma doença febril de início rápido, e caracterizada por artralgia intensa, mialgia, dor de cabeça e erupção (WEAVER & LECUIT, 2015). Os sintomas neurológicos geralmente são precedidos por febre e artralgia. As manifestações clínicas encontradas para os 68 pacientes que vieram a óbito por chikungunya foram consistentes com relatos de casos anteriores de infecções típicas por CHIKV (WEAVER & LECUIT, 2015). No entanto, a detecção do RNA-CHIKV no LCR de 36 pacientes e 4 amostras cerebrais, além da alta frequência de sintomas neurológicos são robustas evidências de um papel neurotrópico do CHIKV associado a uma grave infecção do SNC em mais da metade das mortes por CHIKV. Os estudo de Bonifay *et al.* (2018), em Cayenna, Guiana Francesa, mostraram que a epidemia de chikungunya, ocorrida de fevereiro de 2014 a outubro de 2015, teve o sintoma neurológico como o mais atípico/grave. Entretanto, foram registrados apenas 2 óbitos. No estudo prospectivo de Ferreira *et al.*, 2020, a infecção por CHIKV foi mais frequentemente associada à doenças do Sistema Nervoso Central (SNC), como mielite; enquanto zika foi mais associada à doenças do Sistema Nervoso Periférico (SNP), particularmente, Síndrome de Guillain-Barré. Sabe-se que várias sequelas neurológicas podem ocorrer com a febre chikungunya, sendo a neuropatia periférica o componente mais comum (FERREIRA *et al.*, 2020).

O tropismo neurológico do CHIKV parece ser menor do que o de outros arbovírus, como dengue (DENV), febre do Nilo Ocidental (WNV) ou da febre amarela (YFV), mas vários estudos descreveram manifestações neurológicas, especialmente durante as epidemias (LEWTHWAITE *et al.*, 2009). Podemos citar o WNV, um flavivírus de ciclo enzoótico envolvendo pássaros e, comumente mosquitos *Culex*, como uma das causas de morbidade e mortalidade neurológica significativa, com maior risco para idosos e imunossuprimidos, tendo a encefalite como a manifestação neurológica mais comum nessa infecção (Burton *et al.*, 2004). O DENV é outro flavivírus que possui a capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica, causando, por exemplo, encefalites, meningoencefalites. Nos estudos de Araújo *et al.*, 2012, foram detectados o DENV no LCR de 41 casos de óbitos ocorridos entre os anos de 2005 e 2008 no Ceará, comprovando o tropismo desse arbovírus pelo SNC.

Os casos fatais de CHIK estão associados apenas como resultados de infecção aguda. Em alguns estudos, como o de Ganesan *et al.*, 2008, os dois casos estudados apresentaram sinais neurológicos poucos dias após os primeiros sintomas. Na Malásia, em um

caso reportado por Sam *et al.*, 2010, o paciente veio a óbito 3 dias após o início dos sintomas. Neste estudo, no entanto, foi observado que 16,2% dos casos fatais ocorreram em infecção pós-aguda por CHIKV, com início dos sintomas entre 25 a 90 dias antes da morte, indicando de forma inédita que infecções pós-agudas por CHIKV também podem ter um resultado fatal. Esses achados são consistentes com estudos que demonstram que o pico de excesso de mortes ocorre com um atraso de cerca de um mês em relação aos casos de chikungunya (FREITAS; DONALISIO; ALARCON-ELBAL, 2018). As mortes na fase pós-aguda da infecção pelo CHIKV podem ser subnotificadas, pois sua duração pode desvincular a ideia de associação entre um diagnóstico de chikungunya e um resultado fatal, enquanto aumenta a aparente importância de comorbidades ou mesmo infecções adquiridas em hospitais como a principal causa de morte (LIMA NETO; NASCIMENTO; CASTRO, 2019).

O Centro Nacional de Referência Francês para arbovírus confirmou, em dezembro de 2013, casos autóctones de chikungunya na Ilha de Saint Martin, no Mar do Caribe e o genótipo asiático foi isolado pela primeira vez nas Américas (LEPARC-GOFFART *et al.*, 2014). No Brasil, os primeiros casos autóctones foram confirmados no Oiapoque/Amapá, em setembro de 2014, postulando-se que as cepas circulantes no local foram importadas da Guiana Francesa, um país que faz fronteira com o Oiapoque (NUNES *et al.*, 2015). Os dados genéticos sugeriram múltiplas introduções do genótipo CHIKV-Asiático no Brasil a partir de epidemias que estavam ocorrendo no Caribe e na América do Sul (NUNES *et al.*, 2015). Poucos dias depois, ainda em setembro, também foram confirmados casos autóctones em Feira de Santana, na Bahia. Entretanto, o genótipo circulante era o CHIKV-ECSA, que estava sendo, pela primeira vez, relatado nas Américas (NUNES *et al.*, 2015). Em um curto período de tempo foram notificados casos da doença em todos os estados da federação, com elevado número de casos suspeitos entre os anos de 2014 e 2016 (SILVA *et al.*, 2018). No Ceará, mais de 105.000 casos foram confirmados em 2017, entretanto, o genótipo circulante no estado permanecia desconhecido.

As análises filogenéticas oriundas deste estudo indicam que as cepas de vírus que circularam no Ceará em 2017 pertencem ao genótipo CHIKV-ECSA, o mesmo que foi introduzido no estado da Bahia em 2014 (NUNES *et al.*, 2015). Em seguida, essa linhagem se espalhou amplamente por todo o estado do Ceará. Neste estudo não foram encontradas mutações de aminoácidos associadas à infecção e transmissão aprimoradas em vetores de mosquitos. Da mesma maneira, nos estudos de Sam *et al.*, 2010, também não foram detectadas mutações no gene E1 do CHIKV no primeiro caso de óbito, em epidemia ocorrida na Malásia em 2008.

Diferente do nosso estudo, Schuffenecker *et al.* (2006) constataram que a sequência do genoma de pacientes da Ilha de Reunião sofreu alterações de aminoácidos na região que codifica as proteínas não estruturais e estruturais, onde duas alterações importantes foram observadas na glicoproteína de fusão da membrana E1 (A226V e D284E). Essa mudança no aminoácido predominante na posição 226 da glicoproteína do envelope E1 de Alanina para Valina levantou a hipótese de que essa mutação na glicoproteína E1 poderia ter aumentado a capacidade de infecção do vírus ao mosquito *Ae. albopictus*, já que o principal vetor epidêmico em surtos anteriores, o *A. aegypti*, era incomum na ilha. Hipótese esta confirmada pela investigação de Tsetsarkin *et al.* (2007) que analisaram o papel da mutação E1-A226V na adequação do CHIKV ao *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Descobriram que E1-A226V é diretamente responsável pela adaptação do CHIKV ao *Ae. albopictus*, fornecendo uma explicação plausível de como esse vírus mutante foi capaz de causar uma epidemia, mesmo em uma região sem a presença do vetor típico, o *Ae. Aegypti*. Estes achados demonstraram uma nova visão sobre como uma simples mudança genética em um patógeno humano pode aumentar sua gama de hospedeiros e, conseqüentemente, sua distribuição geográfica.

Em 2012, Shrinet *et al.* observaram duas novas mutações nos genes E1 e E2 do CHIKV (E1:K211E e E2:V264A) em amostras de 2010, em Nova Delhi. Elas causavam um aumento da infectividade e da transmissão pelo *Ae. aegypti* na região, que foi confirmado por Agarwal *et al.*, em 2016, que estudaram o papel das mutações E1:K211E e E2:V264A na modulação da infectividade, disseminação e transmissão tanto pelo *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. O vírus mutante revelou uma adaptação notavelmente maior para o *Ae. aegypti*.

Em 2016, o estudo realizado por Souza, revelou que não houve nenhuma mutação A226V nas cepas de CHIKV do Rio de Janeiro. Entretanto, foi constatada uma alteração de aminoácidos E1-K211T em todas as amostras analisadas, assim como a mutação E1-V156A em duas amostras. Mais estudos são necessários para esclarecer as conseqüências dessas mutações na aptidão dos mosquitos.

Assim como o CHIKV, acredita-se que também o DENV tenha evoluído de um arbovírus enzoótico transmitido por mosquitos *Aedes*, assumindo um ciclo de transmissão urbana. (WANG *et al.*, 2000; VASILAKIS *et al.*, 2011). No entanto, provavelmente devido à vantagem evolutiva de múltiplos sorotipos selecionados por intensificação imunológica, (FERGUSON *et al.*, 1999), DENV evoluiu dentro desses focos enzoóticos em pelo menos 4 sorotipos, enquanto o CHIKV manteve uma variação genética e antigênica muito limitada dentro das 2 linhagens africanas enzoóticas.

## **6 PERSPECTIVAS**

Os resultados desse estudo possibilitam uma melhor compreensão de epidemias de chikungunya no Ceará, ressaltando a importância das pesquisas relacionadas com as arboviroses neuroinvasivas e com a caracterização molecular dos arbovírus no estado, onde circulam os três arbovírus: CHIKV, DENV e ZIKV.

Os resultados reforçam, ainda, a importância de uma vigilância virológica mais estruturada e ativa. Para isso, espera-se que novas metodologias sejam implantadas no Ceará, como a IHQ e o sequenciamento, para que se possa estudar e esclarecer com mais rapidez os óbitos por arboviroses.

Parcerias bem estruturadas com laboratórios de referência e/ou outros centros de estudos devem ser fortalecidos para o aprimoramento da vigilância virológica.

## 7 CONCLUSÃO

- A coorte desse estudo foi caracterizada pelo predomínio de casos fatais no município de Fortaleza, com ligeiro predomínio do sexo feminino, acometendo pessoas jovens e saudáveis;
- A presença de CHIKV no LCR e tecido cerebral desses óbitos sugere infecção do SNC;
- Os resultados sugerem que as mortes por CHIKV podem não ser eventos tão raros durante grandes surtos;
- O risco de morte durante a fase pós-aguda da infecção pelo CHIKV aumenta sete vezes nos casos de pacientes com diabetes, quando comparado aos casos de pacientes sem diabetes;
- As cepas de CHIKV que circularam no Ceará durante a epidemia em 2017 pertencem ao genótipo ECSA;
- As análises filogenéticas sugerem que o CHIKV foi introduzido no Ceará entre o início de 2015 e meados de 2016;
- Não foram encontradas mutações específicas associadas aos casos fatais por CHIKV no Ceará, em 2017.

## REFERÊNCIAS

- ABDELNABI R.; NEYTS J.; DELANG L. **Towards antivirals against the chikungunya virus**. Rega Institute for Medical Research, University of Leuven, Belgium. *Antiviral Research* 121, p. 59–68, 2015.
- AMIN P.; SILVA G. S.; HIDALGO J.; JIMÉNEZ J. I. S.; KARNAD D. R.; RICHARDS G. A. **Chikungunya: Report from the task force on tropical diseases by the World Federation of Societies of intensive and critical care medicine**. *Journal of Care Critical Care*. Vol 46, p. 110-114, 2018.
- ARAÚJO, F. M. C.; ARAÚJO, M. S.; NOGUEIRA, R. M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; OLIVEIRA, D. N.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. **Central nervous system involvement in dengue A study in fatal cases from a dengue endemic area**. *Neurology*, Vol 78, n. 10, p. 736- 742, 2012.
- AZEVEDO, R.S.S.; OLIVEIRA, C.S.; VASCONCELOS, P.F.C. **Risco do Chikungunya para o Brasil**. *Rev. Saúde Pública*, p. 49-58, 2015.
- BALESTRA, R. A. M.; PEREIRA, R. K. O.; RIBEIRO, M. J. S.; SILVA, J. S.; ALENCAR, J. **Ocorrência de Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse) em Área Urbana do Estado do Tocantins**. *Neotropical Entomology* 37(2):233-235 (2008).
- BORGHERINI G; POUBEAU P; STAIKOWSKY F *et al.* **Chikungunya Outbreak on Reunion Island**. *Clinical Infectious Diseases*, p. 44:1401–7, 2007.
- BONIFAY T, PRINCE C, NEYRA C, DEMAR M, ROUSSET D, KALLEL H, *et al.* **Atypical and severe manifestations of chikungunya virus infection in French Guiana: A hospital-based study**. *PLoS ONE* 13(12): e0207406. [https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0207406](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207406). 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública. **Desenhos dos oligonucleotídeos para DENV, ZIKV e CHIKV**. 8p. 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Preparação e resposta à introdução do Vírus Chikungunya no Brasil**. 100 p. 29. Brasília 2014a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Boletim Epidemiológico Nº 22**. Volume 45. 2014b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Chikungunya: Manejo Clínico**. Brasília, 2017. Acesso: [http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/chikungunya\\_manejo\\_clinico\\_led.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/chikungunya_manejo_clinico_led.pdf)
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika**. *Semana Epidemiológica* 50, Volume 48. Brasília, 2017a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Boletim Epidemiológico Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika**. Brasília, DF. N. 15, V. 49, 1ª à 11ª semana epidemiológica, jan./mar. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde: volume único [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. – 3ª. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2019.**

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Boletim Epidemiológico Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes aegypti (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 38, 2020**. Brasília, DF. N. 41, V. 51, Outubro 2020.

BRITO, C. A. A. DE *et al.* **Pharmacologic management of pain in patients with Chikungunya: a guideline**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 49, n. 6, p. 668–679, 2016.

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

CARVALHO R. G.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R.; BRAGA I. A. **Updating the geographical distribution and frequency of Aedes albopictus in Brazil with remarks regarding its range in the Americas**. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014 set;109(6):787–96.

CASOLARI S.; BRIGANTI E.; ZANOTTI M. *et al.* **A fatal case of encephalitis associated with Chikungunya virus infection**. Scandinavian journal of infectious diseases, 40(11-12): 995-6, 2008.

CASTRO, A. P. C. R; LIMA, R. A; NASCIMENTO, J. S. **Chikungunya: vision of the pain clinician**. Rev Dor. São Paulo, out-dez;17(4):299-302. 2016.

CAVALCANTI, L. P. G *et al.* **Experiência do Comitê de Investigação de Óbitos por Arboviroses no Ceará em 2017: avanços e desafios**. Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, 28(3):e2018397, 2019.

CEARÁ, Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, Núcleo de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico SE 36**. 1-6. 2016.

CEARÁ, Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, Núcleo de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico SE 39**. 1-13. 2017.

CEARÁ, Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, Núcleo de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico SE 52**. 03 de abril de 2018. 1-13. 2017a.

CEARÁ, Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, Núcleo de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico SE 52** de 2018. 18 de janeiro de 2019a; 1-17. 2019a.



CEARÁ, Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, Núcleo de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico SE 12**. 29 de março de 2019b; 1-14. 2019b.

CEARÁ, Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, Núcleo de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico SE 43**. 13 de dezembro de 2019c; 1-15. 2019c.

CEARÁ, Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, Célula de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico Arboviroses Urbanas**. Nº 8. 09/10/2020; 1-15. 2020.

CHARLYS DA COSTA, A. *et al.* **Spread of Chikungunya Virus East/Central/South African Genotype in Northeast Brazil**. *Emerging Infectious Diseases*, v. 23, n. 10, p. 1742-1744, 2017.

CHARREL, R. N. **Diagnosis of arboviral infections – A quagmire of cross reactions and complexities**. *Travel Medicine And Infectious Disease*, [s.l.], v. 14, n. 1, p.11-12, Elsevier BV. jan. 2016.

CHENG, G.; LIU, Y.; WANG, P.; XIAO, X. **Mosquito defense strategies against viral infection**. *Trends in Parasitology*. 2017.

CHEVILLON, C *et al.* **The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective**. *Trends in Microbiology*, v. 16, n. 2, p. 80-88, 2008.

CHU, J. J. H.; ANG, S. K. **Chikungunya Virus**. Springer. ISBN 1493936166. 2016.

CHUA H.H.; ABDUL RASHID K.; LAW W.C *et al.* **A fatal case of chikungunya virus infection with liver involvement**. *The Medical journal of Malaysia*; 65(1): 83-4. 2010.

CLEMENTS A. N. **The Biology of mosquitoes: development, nutrition and reproduction**. Book Review. VOL 1. ISBN: 9780851993744. 1992.

CONSOLI R. A. G. B.; OLIVEIRA R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil** [Internet]. Rio de Janeiro: FioCruz; 1994. Disponível em: <http://static.scielo.org/scielobooks/th/pdf/consoli-9788575412909>.

CUNHA, M. D. P. *et al.* **Outbreak of chikungunya virus in a vulnerable population of Sergipe, Brazil-A molecular and serological survey**. *Journal of Clinical Virology*, VOL 97, p. 44-49, dez. 2017.

DE FIGUEIREDO, M. L. G.; FIGUEIREDO, L. T. M. **Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 47(6):677-683, Nov-Dec, 2014.

DE LIMA E. C. B.; JANUÁRIO A. M. S.; FORTUNA E. G.; REAL M. E. C.; LACERDA H. R. **Chikungunya encephalitis: report of a fatal case in Northeastern Brazil**. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 62:e40. 2020.

DINIZ, C. *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, n2, p. 421–437, 2017.

- DONALD E. CAREY. **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**, Volume XXVI, Issue 3, July 1971, Pages 243–262, <https://doi.org/10.1093/jhmas/XXVI.3.243>.
- DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; VON ZUBEN, A. P. B. **Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública**. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, VOL 51, p. 1-6, 2017.
- ECONOMOPOULOU A.; DOMINGUEZ M.; HELYNCK B., *et al.* **Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Reunion**. *Epidemiology and Infection*; 137(4): 534-41. 2009.
- EKSTROM M.; LILJESTRÖM P.; GAROFF H. **Membrane protein lateral interactions control Semliki Forest virus budding**. *The EMBO Journal*. 13(5):1058-64. 1994.
- FERREIRA, M. L. B.; ALBUQUERQUE, M. F. P. L.; BRITO, C. A. A. *et al.* **Neurological disease in adults with Zika and chikungunya virus infection in Northeast Brazil: a prospective observational study**. *Lancet Neurol*, VOL 19: 826–39. 2020.
- FERNANDEZ, M. L.; NAVARRO, Y. P. T. **Fiebre Chikungunya**. *Revista cubana de medicina*, Ciudad de la Habana, v. 54, n. 1, p:74-96, Mar 2015.
- FRANZ, A. W. E.; KANTOR, A. M.; PASSARELLI, A. L.; CLEM, R. J. **Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes**. *Viruses*. 2015.
- FREITAS A. R. R.; DONALISIO M.R.; ALARCON-ELBAL P. M. **Excess Mortality and Causes Associated with Chikungunya, Puerto Rico, 2014-2015**. *Emerging infectious diseases*, 24(12): 2352-5. 2018.
- FROLOVA, E. I. *et al.* **Functional Sindbis Virus Replicative Complexes Are Formed at the Plasma Membrane**, *Journal of Virology*, 8 VOL 4, n. 22, p. 11679–11695. 2010.
- FROS, J. J.; PIJLMAN, G. P. **Alphavirus Infection: Host Cell Shut-Off and Inhibition of Antiviral Responses**. *Viruses*, VOL 8, n. 6, 2016.
- FUMAGALLI M. J.; DE SOUZA W. M.; ESPOSITO D. L. A., *et al.* **Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant envelope protein 2 antigen for diagnosis of Chikungunya virus**. *Virology journal*, VOL 5:112. 2018.
- GARAY-MORÁN C.; ROMÁN-PEDROZA J. F.; LÓPEZ-MARTÍNEZ I.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ J. C.; RUIZ-MATUS C.; KURIMORALES, *et al.* **Caracterización clínica y epidemiológica de casos de fiebre chikungunya en México**. *Rev Panam Salud Publica*. 41:e58. 2017.
- GARDY, J. L.; LOMAN, N. J. **Towards a genomics-informed, real-time, global pathogen surveillance system**. *Nature Reviews Genetics*, v. 19, p. 9, 2017.
- GAROFF H.; SJOBERG M.; CHENG R. H. **Budding of alphaviruses**. *Virus Research* 106, p 103-116. 2004.

GILL M. S.; LEMEY P.; FARIA N. R.; RAMBAUT A.; SHAPIRO B.; SUCHARD M. A. **Improving Bayesian population dynamics inference: a coalescent-based model for multiple loci.** *Molecular biology and evolution.* 30(3): 713-24. 2013.

GOUPIL, B. A.; MORES, C. N. **A Review of Chikungunya Virus-induced Arthralgia: Clinical Manifestations, Therapeutics, and Pathogenesis.** *The open rheumatology journal,* VOL 10, p. 129–140, 2016.

GREGIANINI, T. S. *et al.* **Emerging arboviruses in Rio Grande do Sul, Brazil: Chikungunya and Zika outbreaks, 2014-2016.** *Reviews in Medical Virology,* VOL 27, n. 6, p. e1943, 2017.

GRUBAUGH, N. D. *et al.* **Tracking virus outbreaks in the twenty-first century.** *Nature Microbiology,* v. 4, n. 1, p. 10-19, 2019.

GUBLER, D. J. **Dengue and dengue hemorrhagic fever.** *Clin. Microbiol. Rev.,* VOL 11, p. 480-496, 1998.

HALL, W. C.; CROWELL, T. P.; WATTS, D. M., BARROS, V. L. R.; KRUGER, H.; PINHEIRO, F.; CLARENCE J.PETERS, C. J. **Demonstration of yellow fever and dengue antigens in formalin-fixed paraffin embedded human liver by immunohistochemical analysis.** *Am J Trop Med Hyg,* n. 45, p. 408-17, 1991.

HONÓRIO N. A.; CÂMARA D. C. P.; CALVET G. A.; BRASIL P. **Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil.** *Cad. Saúde Pública,* Rio de Janeiro, 31(5): 906-908, 2015.

HOZ J. M.; BAYONA B.; VILORIA S.; ACCINI J. L.; JUAN-VERGARA H. S.; VIASUS D. **Fatal cases of Chikungunya virus infection in Colombia: Diagnostic and treatment challenges.** *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology,* 69: 27-9. 2015.

JESSIE, K.; FONG, M. Y.; DEVI, S.; LAM, S. K.; WONG, K. T. **Localization of Dengue Virus in Naturally Infected Human Tissues, by Immunohistochemistry and In Situ Hybridization.** *The Journal of Infectious Diseases,* n.189, p. 1411–8, 2004.

JOHNSON B. W.; RUSSELL B. J.; LANCIOTTI R. S. **Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay.** *Journal of clinical microbiology;*43:4977-83, 2005.

JOHNSON B. W.; RUSSELL B. J.; GOODMAN C. H. **Commercial Sources for Diagnostic Assays,** v. 214, n July 2015, 2017.

JOSHI P.; YADAV P.; MOURYA D.; SAHARE L.; UKEY M.; KHEDEKAR R.; PATIL D. & BARDE P. V. **Laboratory surveillance of chikungunya in Madhya Pradesh, India (2016-2017).** *Indian J Med Res* 151, p 87-92 DOI: 10.4103/ijmr.IJMR\_204\_19. January 2020.

KATOH K.; MISAWA K.; KUMA K.; MIYATA T. **MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform.** *Nucleic acids research;*

30(14): 3059-66. 2002.

KELVIN, A. A. *et al.* **Inflammatory Cytokine Expression Is Associated with Chikungunya Virus Resolution and Symptom Severity.** PLOS Neglected Tropical Diseases, VOL 5, n. 8, p. 1–12, 2011.

KHATRI H.; SHAH H.; ROY D.; TRIPATHI K. M. **A Case Report on Chikungunya Virus-Associated Encephalomyelitis.** Case Reports in Infectious Diseases Volume 2018, Article ID 8904753, 4 pages <https://doi.org/10.1155/2018/8904753>. 2018.

KIELIAN, M.; REY, F. A. **Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin.** Nature Reviews Microbiology, VOL 4, n. 1, p. 67-76, 2006.

KIIVER, K. *et al.* **Properties of non-structural protein 1 of Semliki Forest virus and its interference with virus replication.** Journal of General Virology, VOL 89, n. Pt 6, p. 1457–1466. 2008.

KRAEMER M. U. G.; SINKA M. E.; DUDA K. A.; MYLNE A.; SHEARER F. M.; BARKER C. M. *et al.* **The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*** [Internet]. Elife, jun;4:e08347. 2015.

KUMAR, N. P.; SURESH, A.; VANAMAIL, P.; SABESAN, S.; KRISHNAMOORTHY, K. G.; MATHEW, J.; JOSE, V. T. *et al.* **Chikungunya virus outbreak in Kerala, India, 2007: a seroprevalence study.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, VOL 106, n. 8, p. 912-916, December 2011.

HOZ *et al.* **Fatal cases of Chikungunya virus infection in Colombia: Diagnostic and treatment challenges.** Journal of Clinical Virology 69, 27–29, 2015.

LABADIE K.; LARCHER T.; JOUBERT C.; MANNIOUI A.; DELACHE B.; BROCHARD P. *et al.* **Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages.** J Clin Invest, 120(3):894-906, 2010.

LANCIOTTI R. S.; KOSOY O. L.; LAVEN J. J. *et al.* **Chikungunya Virus in US Travelers Returning from India, 2006.** Emerging Infectious Diseases, [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid), VOL 13, n 5, p 764-7. May 2007.

LANCIOTTI R. S.; KOSOY O. L.; LAVEN J. J. *et al.* **Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007.** Emerging infectious diseases, 14:1232-9, 2008.

LARAS K.; SUKRI N. C.; LARASATI R. P.; BANGS M. J.; KOSIM R.; DJAUZI S. *et al.* **Tracking the re-emergence of epidemic chikungunya virus in Indonesia.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 2005;99(2):128-41. DOI:10.1016/j.trstmh.2004.03.013. 2005.

LEPARC-GOFFART I.; NOUGAIREDE A.; CASSADOU S.; PRAT C.; DE LAMBALLERIE X. **Chikungunya in the Americas.** Lancet.;383:514. 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, VOL 2011, 2011.

LEWTHWAITE P.; VASANTHAPURAM R.; OSBORNE J. C.; BEGUM A.; PLANK J. L.; SHANKAR M. V. *et al.* **Chikungunya virus and central nervous system infections in children, India.** Emerg Infect Dis; 15:329-31. DOI: 10.3201/eid1502.080902 PMID: 19193287. 2009.

LI, L. *et al.* **Structural Changes of Envelope Proteins During Alphavirus Fusion.** Nature, v. 468, n. 3, p. 705–708, 2011.

LIMA NETO A. S.; SOUSA G. S.; NASCIMENTO O. J.; CASTRO M. C. **Chikungunya-attributable deaths: A neglected outcome of a neglected disease.** PLoS neglected tropical diseases;13:e0007575. 2019.

LUM, F. M.; LISA, F. P. Ng. **Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis.** Antiviral Research, VOL 120, n. June, p. 165-174, 2015.

MARTINS, V. E. P.; ALENCAR, C. H. M.; FACÓ, P. E. G.; DUTRA, R. F.; ALVES, C. R.; PONTES, R. J. S.; GUEDES, M. I. F. **Spatial distribution and breeding site characteristics of Aedes albopictus and Aedes aegypti in Fortaleza, State of Ceará.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 43(1):73-77, jan-fev, 2010.

MCFARLANE, M.; ARIAS-GOETA, C.; MARTIN, E.; O'HARA, Z. **Characterization of Aedes aegypti innate-immune pathways that limit Chikungunya virus replication.** PLoS Neglected Tropical Diseases. 2014.

MCBRIDE, W. J. H.; BIELEFELDT-OHMANN, H. **Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology.** Microbes Infect., v. 2, p. 1041-1050, 2000.

MERITS, A.; VASILJEVA L.; AHOLA T.; KAARIAINEN L.; AUVINEN P. **Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-structural polyprotein by nsP2 protease.** Journal of General Virology, v. 82, n. 4, p. 765–773, 2001.

MOORE C. G.; FRANCY D. B.; ELIASON D. A.; MONATH T. P. **Aedes albopictus in the United States: rapid spread of a potential disease vector.** J Am Mosq Control Assoc;4(3):356–61. 1988.

MOURYA, D. T. and MISHRA, A. C. **Chikungunya fever.** Lancet 368, 186–187. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69017-X. 2006.

MURRAY N. E. A.; QUAM M. B.; WILDER-SMITH A. **Epidemiology of dengue: past, present and future prospects.** Clinical Epidemiology, VOL 5 299–309. 2013.

NAVECA, F. G. *et al.* **Chikungunya virus outbreak in the Amazon region: replacement of the Asian genotype by an ECSA lineage.** bioRxiv, p. 492595, 2018.

NUNES M. R.; FARIA N. R.; DE VASCONCELOS J. M. *et al.* **Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil.** BMC medicine 13:102. 2015.

OLIVEIRA R.; BARRETO F. K. A.; MAIA A. *et al.* **Maternal and infant death after probable vertical transmission of chikungunya virus in Brazil - case report.** BMC infectious diseases; 18(1): 333. 2018.

PAHO/WHO PAHO. **Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas, by Country or Territory.** Washington, USA 2019.

PASTORINO B.; MUYEMBE-TAMFUM J. J.; BESSAUD M.; TOCK F.; TOLOU H.; DURAND J. P. *et al.* **Epidemic resurgence of Chikungunya virus in democratic Republic of the Congo: identification of a new central African Strain.** J Med Virol. 74(2):277-82. DOI:10.1002/jmv.20168. 2004.

PESSOA M.V.E.; SILVEIRA D.A.; CAVALCANTE I.L.; FLORINDO M.I. **Aedes albopictus no Brasil: aspectos ecológicos e riscos de transmissão da dengue.** Entomotopica 28: 75-86; 2013.

PIALOUX G.; GAÜZÈRE B. A.; JAURÉGUIBERRY S.; STROBEL M. **Chikungunya, an epidemic arbovirose.** Lancet Infect. Dis. 7, 319-327. 2007.

POWERS A. M.; LOGUE C. H. **Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus.** J Gen Virol; 88(9):2363-77. DOI:10.1099/vir.0.82858-0. 2007.

PONGSIRI, P. *et al.* **Multiplex real-time RT-PCR for detecting chikungunya virus and dengue virus.** Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, Heidelberg, v. 5, n. 5, p. 342-346, 2012.

PRAT, C. M. *et al.* **Evaluation of commercially available serologic diagnostic tests for Chikungunya virus.** Emerging Infectious Disease, VOL 20, n. 12, p. 2129-32, 2014.

QUICK J.; GRUBAUGH N. D.; PULLAN S. T. *et al.* **Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples.** Nature protocols, 12(6): 1261-76. 2017.

RAMPAL, SHARDA M, MEENA H. **Neurological complications in chikungunya fever.** J Assoc Physicians India. 2007; 55. NOVEMBER:765-9

RAO T. R.; ANDERSON C. R. **Concluding Review on the Papers on the Outbreak of Febrile Illness with Haemorrhagic Manifestations in Calcutta.** The Indian journal of medical research, 52: 727-34. 1964.

RENAULT P.; SOLET J. L.; SISSOKO D.; BALLEYDIER E.; LARRIEU S. *et al.* **A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005–2006.** Am J Trop Med Hyg 77: 727–731. 2007.

ROBINSON M. C. **An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53.** I. Clinical features. Trans R Soc Trop Med Hyg. 49(1):28-32. 1955.

RODRIGUES F. M.; PATANKAR M. R.; BANERJEE K. *et al.* **Etiology of the 1965 epidemic of febrile illness in Nagpur city, Maharashtra State, India.** Bulletin of the World Health Organization , 46(2): 173-9. 1972.

ROSS R. W. **The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic.** J Hyg (Lond). 54(2):177-91. 1956.

ROUGERON, V. S. *et al.* **Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease the emerged to be a new health global risk.** *Journal of Clinical Virology*. 64:144-52. 2015.

RUPP J. C. *et al.* **Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions.** *Journal of General Virology*, VOL 96, n. 9, p. 2483–2500. 2015.

SA P. K. O.; NUNES M. M.; LEITE I. R. *et al.* **Chikungunya virus infection with severe neurologic manifestations: report of four fatal cases.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50(2): 265-8. 2017.

SAM I. C.; KAMARULZAMAN A.; ONG G. S. Y.; VERIAH R. S.; PONNAMPALAVANAR, S.; CHAN Y. F.; and ABUBAKAR S. **Chikungunya virus-associated death in Malaysia.** *Tropical Biomedicine* 27(2): 343–347, 2010.

SCHILTE, C. *et al.* **Cutting Edge: Independent Roles for IRF-3 and IRF-7 in Hematopoietic and Nonhematopoietic Cells during Host Response to Chikungunya Infection.** *The Journal of Immunology*, VOL 188, p. 2967-2971, 2012.

SCHUFFENECKER, I.; ITEMAN, I.; MICHAULT, A.; MURRI, S. *et al.* **Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak.** *Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. PLOS Medicine* 3(7): e263. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030263>. 2006.

SCHWARTZ O.; ALBERT, M. L. **Biology and pathogenesis of chikungunya virus.** *Nature reviews. Microbiology*, VOL 8, n. 7, p. 491–500, 2010.

SCOTT T. W.; CLARK G. G.; LORENZ L. H.; AMERASINGHE P. H.; REITER P.; EDMAN J. D. **Detection of multiple blood feeding in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histologic technique.** *J Med Entomol*, jan;30(1):94–9. 1993.

SHRINET J.; JAIN S.; SHARMA A.; SINGH S. S.; MATHUR K.; RANA V.; BHATNAGAR R. K.; GUPTA B.; GAIND R.; DEB M. and SUNIL S. **Genetic characterization of Chikungunya virus from New Delhi reveal emergence of a new molecular signature in Indian isolates.** *Virology Journal*, 9:100. 2012.

SIMIAO A. R.; BARRETO F. K. A.; OLIVEIRA R. *et al.* **A major chikungunya epidemic with high mortality in northeastern Brazil.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 52: e20190266. 2019.

SIMMONS, M. *et al.* **Development and Validation of a Quantitative, One-Step, Multiplex, Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of Dengue and Chikungunya Viruses.** *Journal of clinical microbiology*, Washington, VOL 54, n. 7, p. 1766-1773, 2016.

SILVA, L. A. and DERMODY, T. S. **Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies.** *J Clin Invest*, 127(3):737–749, 2017.

SILVA, N. M. da *et al.* **Vigilância de chikungunya no Brasil: desafios no contexto da Saúde Pública.** *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. Brasília, VOL 27, n. 3, e2017127, 2018.

SISSOKO D.; MALVY D.; EZZEDINE K. *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, 3(3): e389. 2009. 2009.

SOLIGNAT, M. *et al.* **Replication cycle of chikungunya : A re-emerging arbovirus.** Virology, v. 393, n. 2, p. 183–197, 2009.

SOLOMON T, DUNG N M, VAUGHN D W *et al.* **Neurological manifestations of dengue infection.** Lancet; 355: 1053–1059. 2000.

SOURISSEAU, M. *et al.* **Characterization of reemerging chikungunya virus.** PLoS Pathogens, VOL 3, n. 6, p. 0804–0817, 2007.

SOUSA, A. Q.; CAVALCANTE, D. I. M.; FRANCO, L. M.; ARAÚJO, F. M. C.; SOUSA, E. T.; VALENÇA-JÚNIOR, J. T.; ROLIM, D. B.; MELO, M. E. L.; SINDEAUX, P. D. T.; ARAÚJO, M. T. F.; PEARSON, R. D.; WILSON, M. E.; POMPEU, M. M. L. **Postmortem Findings for 7 Neonates with Congenital Zika Virus Infection.** Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 23, No. 7, July 2017.

SOUZA, A. F. P. V. B. **Estudos genômicos, filogenéticos e proteômicos de alfavírus.** Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. 2019.

SOUZA, T. M. A. **Vigilância do vírus chikungunya na atual tríplice epidemia de arbovírus no Brasil: investigação de casos suspeitos e genotipagem dos vírus circulantes. 2016.** 140 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária)- Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

STAMATAKIS A. **RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies.** Bioinformatics 30(9): 1312-3. 2014.

STRAUSS; ELLEN G.; STRAUSS; JAMES H. **Structure and replication of the alphavirus genome.** In: The Togaviridae and Flaviviridae. Springer New York, p. 35-90, 1986.

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

SUHRBIER, A. **Rheumatic manifestations of chikungunya: emerging concepts and interventions.** *Nat Rev Rheumatol* 15, 597–611, 2019.

SUCHARD MA, LEMEY P, BAELE G, AYRES DL, DRUMMOND AJ, RAMBAUT A. **Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10.** Virus evolution, 4(1): vey 016. 2018.

SUOMALAINEN M.; LILJESTRÖM P.; GAROFF H. **Spike protein-nucleocapsid interactions drive the budding of alphaviruses.** Journal of Virology. 66(8):4737-47. 1992.

TANABE, E. L. L. *et al.* **Report of East-Central South African Chikungunya virus genotype during the 2016 outbreak in the Alagoas State, Brazil.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, VOL 60, p. e19, 2018.



THIBERVILLE, S. *et al.* **Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy.** Antiviral Research, Orsay, p. 345–370, VOL 99, 2013.

TSETSARKIN K A; VANLANDINGHAM D L; MCGEE C E, HIGGS S. **A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential.** PLoS Pathog. 2007;3(12):e201. DOI:10.1371/journal.ppat.0030201.

VARJAK M.; ZUSINAITE E.; MERITS A. **Novel Functions of the Alphavirus Nonstructural Protein nsP3 C-Terminal Region.** Journal of Virology, v. 84, n. 5, p. 2352–2364, 2010.

VASILAKIS N.; CARDOSA J.; HANLEY K. A.; HOLMES E. C. and WEAVER S. C. **Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health.** Nature reviews. Microbiology VOL 9, p. 532-541. July 2011.

VOLK, S. M.; CHEN R.; TSETSARKIN, K. A.; ADAMS, A. P.; GARCIA, T. I.; SALL, A. A.; NASAR F.; SCHUH, A. J.; HOLMES, E. C.; HIGGS, S.; MAHARAJ, P. D.; BRAULT, A. C.; WEAVER, S. C. **Genome-Scale Phylogenetic Analyses of Chikungunya Virus Reveal Independent Emergences of Recent Epidemics and Various Evolutionary Rates.** Journal of Virology. 84(13):6497-504. 2010.

WAHID *et al.* **Global Expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history.** International Journal of Infectious Diseases 58, 69-76, 2017.

WANG *et al.* **Evolutionary relationships among Dengue viruses.** Journal of Virology, VOL 74; n.7, p. 3227–3234. Apr. 2000.

WEAVER S. C. **Arrival of Chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health.** PLoS Negl Trop Dis. 8(6):e2921. DOI:10.1371/journal.pntd.0002921. 2014.

WEAVER S. C. and LECUIT M. **Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease.** The New England Journal of Medicine, 372;13, March 26, 2015.

WÖLFEL, S. *et al.* **Complete genome sequence of a Chikungunya virus imported from Bali to Germany.** Genome Announcements, VOL 3, n. 2, p. e00164-15, 2015.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. **Real-time PCR for mRNA quantitation.** Biotechniques, Natick, VOL 39, n. 1, p. 75-85, 2005.

ZARA A. L. S. A.; SANTOS S. M.; OLIVEIRA E. S. F.; CARVALHO R. G.; COELHO G. E. **Estratégias de controle do Aedes aegypti: uma revisão.** Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, 25(2):391-404, abr-jun 2016.

**ANEXO 1**  
**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA**

UFC - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ /



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ASPECTOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E HISTOPATOLÓGICOS DOS ÓBITOS POR ARBOVIROSES QUE FORAM NECROPSIADOS NO CEARÁ, 2011 - 2017

**Pesquisador:** JOHN WASHINGTON CAVALCANTE

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 85921418.3.0000.5054

**Instituição Proponente:** Departamento de Patologia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.583.257

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um projeto de dissertação do programa de pós-graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará que pretende conhecer os principais achados clínicos, laboratoriais e histopatológicos dos casos de óbitos por arbovírus que foram necropsiados no Ceará, entre os anos de 2011 e 2017

**Objetivo da Pesquisa:**

GERAL: Conhecer os principais achados clínicos, laboratoriais e histopatológicos dos casos de óbitos por arbovírus que foram necropsiados no Ceará, entre os anos de 2011 e 2017

ESPECÍFICOS:

- Descrever os achados clínicos e laboratoriais dos óbitos confirmados por chikungunya que foram necropsiados no Ceará, 2016 – 2017.
- Descrever os aspectos histopatológicos dos óbitos confirmados por chikungunya que foram necropsiados no Ceará, 2016 – 2017.
- Comparar os achados clínicos, laboratoriais e de histopatológicos dos óbitos por dengue (2011/2012) e chikungunya (2016/2017).
- Comparar os achados de necropsia dos casos de dengue (2011/2012) e chikungunya (2016/2017).
- Estimar a prevalência das principais comorbidades e coinfeções presentes nos óbitos

Continuação do Parecer: 2.583.257

necropsiados, comparando os casos de dengue (2011/2012) com chikungunya (2016/2017).

- Descrever e comparar as principais causas imediatas de morte dos óbitos necropsiados com dengue (2011/2012) e chikungunya (2016/2017).

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos: mínimos, pois os dados serão coletados de prontuários do Serviço de Verificação de Óbitos.

Benefícios: ampliar os conhecimentos sobre a fisiopatologia das arboviroses, especificamente para a dengue e chikungunya e os fatores determinantes para a evolução desfavorável, para melhorar o planejamento da assistência, vigilância e o controle das doenças.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um estudo descritivo, com caráter retrospectivo e abordagem quantitativa, envolvendo pacientes acometidos por arbovírus que foram necropsiados pelo SVO-RF e que foram notificados para o Núcleo de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Saúde do Ceará, como suspeitos. Serão investigados todos os casos de óbitos por arbovírus, de pacientes residentes no Estado do Ceará, que forem notificados para Secretaria de Saúde do Ceará, com suspeita de arbovírus no período de 01/01/2011 e 31/12/2017.

Inicialmente serão identificados no sistema de vigilância epidemiológica (SINAN) os casos de óbitos confirmados, por critério laboratorial, por arbovírus no período de estudo. Posteriormente serão separados aqueles em que foi realizada necropsia pelo SVO-RF.

Identificados os casos a serem estudados, a coleta dos dados será feita por meio de um questionário semi-estruturado, onde estão incluídas as variáveis do estudo. Para preenchimento dessas fichas serão revisados os prontuários, laudos de necropsia e declarações de óbitos, buscando-se identificar fatores determinantes e relevantes para causas desses óbitos. Será feita uma revisão de lâminas realizando-se processamento histológico de amostra de órgãos e tecidos e posterior análise microscópica, para complementar e confrontar as informações constantes nos laudos de necropsias. Para realizar o procedimento histopatológico, serão feitas as lâminas e posterior coloração das mesmas, a partir de amostras arquivadas em blocos de parafina no laboratório de histologia do SVO-RF.

Posteriormente será realizado um estudo comparativo do perfil dos óbitos atribuídos ao vírus da Chikungunya, em autópsias realizadas entre os anos de 2016 e 2017; com um estudo já realizado nos anos de 2011 e 2012 com os óbitos por dengue, antes da circulação do CHIKV no Ceará. As informações serão confrontadas e complementadas pela revisão das fichas de

Continuação do Parecer: 2.583.257

notificação e investigação do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), de prontuários de pacientes que foram internados e fichas de investigação de óbitos disponíveis no Núcleo de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Saúde do Estado (NVEP-CE).

Os dados serão analisados utilizando-se o programa Epi-info versão 3.5.1. Serão realizadas tabelas e gráficos, onde serão feitas as comparações dos dados obtidos nos formulários.

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

Foram apresentados adequadamente: Ofício de encaminhamento ao CEP; Currículo do pesquisador responsável; cronograma; orçamento; declaração dos pesquisadores; Folha de rosto; autorização do local onde a pesquisa será realizada; solicitação de dispensa do TCLE; Termo de Fiel depositário.

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

Sem pendências

**Considerações Finais a critério do CEP:**

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1076817.pdf	21/03/2018 14:23:10		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	21/03/2018 14:22:34	LUCIANO PAMPLONA DE GOES CAVALCANTI	Aceito
Outros	fielSESA.jpeg	21/03/2018 14:17:27	LUCIANO PAMPLONA DE GOES CAVALCANTI	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	InfraSESA.jpeg	21/03/2018 14:15:46	LUCIANO PAMPLONA DE GOES CAVALCANTI	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	21/03/2018 14:11:12	LUCIANO PAMPLONA DE GOES CAVALCANTI	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORIZACAOSVO.pdf	21/03/2018 14:08:34	LUCIANO PAMPLONA DE GOES CAVALCANTI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	ISENCAO.pdf	21/03/2018 14:07:37	LUCIANO PAMPLONA DE	Aceito

UFC - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 2.583.257

Justificativa de Ausência	ISENCAO.pdf	21/03/2018 14:07:37	GOES CAVALCANTI	Aceito
Outros	fielSVO.pdf	21/03/2018 14:06:52	LUCIANO PAMPLONA DE GOES CAVALCANTI	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	21/03/2018 14:05:27	LUCIANO PAMPLONA DE GOES CAVALCANTI	Aceito
Outros	apresentacao.pdf	21/03/2018 14:04:29	LUCIANO PAMPLONA DE GOES CAVALCANTI	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

FORTALEZA, 05 de Abril de 2018

---

**Assinado por:**  
**FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA**  
(Coordenador)

## ANEXO 2

## 1. Artigo Publicado

Clinical Infectious Diseases

MAJOR ARTICLE



## Fatal Outcome of Chikungunya Virus Infection in Brazil

Shirlene Telmos Silva de Lima,<sup>1,2\*</sup> William Marciel de Souza,<sup>3,4\*</sup> John Washington Cavalcante,<sup>1,2\*</sup> Darlan da Silva Candido,<sup>4,5\*</sup> Marcilio Jorge Fumagalli,<sup>2,6\*</sup> Jean-Paul Carrera,<sup>4,5</sup> Leda Maria Simões Mello,<sup>2</sup> Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo,<sup>2,6</sup> Izabel Leticia Cavalcante Ramalho,<sup>2</sup> Francisca Kalline de Almeida Barreto,<sup>1</sup> Deborah Nunes de Melo Braga,<sup>7</sup> Adriana Rocha Simião,<sup>1</sup> Mayara Jane Miranda da Silva,<sup>8</sup> Rhaquel de Moraes Alves Barbosa Oliveira,<sup>1</sup> Clayton Pereira Silva Lima,<sup>9</sup> Camila de Sousa Lins,<sup>8</sup> Rafael Ribeiro Barata,<sup>8</sup> Marcelo Nunes Pereira Melo,<sup>4</sup> Michel Platini Caldas de Souza,<sup>4</sup> Luciano Monteiro Franco,<sup>4</sup> Fábio Rocha Fernandes Távora,<sup>4</sup> Daniele Rocha Queiroz Lemos,<sup>8</sup> Carlos Henrique Moraes de Alencar,<sup>1</sup> Ronaldo de Jesus,<sup>3</sup> Wagner de Souza Fonseca,<sup>3,10</sup> Leonardo Hermes Dutra,<sup>10</sup> André Luiz de Abreu,<sup>11</sup> Emerson Luiz Lima Araújo,<sup>12</sup> André Ricardo Ribas Freitas,<sup>11</sup> João Lídio da Silva Gonçalves Vianez Júnior,<sup>3</sup> Oliver G. Pybus,<sup>4</sup> Luiz Tadeu Moraes Figueiredo,<sup>3</sup> Nuno Rodrigues Faria,<sup>4,12\*</sup> Márcio Roberto Teixeira Nunes,<sup>8,9</sup> Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti,<sup>1,2\*</sup> and Fabio Miyajima<sup>1,12\*</sup>

<sup>1</sup>Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, <sup>2</sup>Central Public Health Laboratory of Ceará State, Fortaleza, Brazil, <sup>3</sup>Virology Research Center, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, <sup>4</sup>Department of Zoology, University of Oxford, Oxford, United Kingdom, <sup>5</sup>Department of Research in Virology and Biotechnology, Gorgas Memorial Institute of Health Studies, Panama City, Panama, <sup>6</sup>Faculdade de Medicina do Centro Universitário Christus, Fortaleza, Ceará, Brazil, <sup>7</sup>Death Verification Service Dr Rocha Furtado, State Health Secretariat of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil, <sup>8</sup>Evandro Chagas Institute, Ministry of Health, Aracaju, Brazil, <sup>9</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil, <sup>10</sup>Ministry of Health, Brasília, Brazil, <sup>11</sup>Faculdade de Medicina São Leopoldo Mandic, Campinas, São Paulo, Brazil, <sup>12</sup>Department of Infectious Disease Epidemiology, Imperial College London, London, United Kingdom, and <sup>13</sup>Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Branch Ceará, Eusebio, Brazil

**Background.** Chikungunya virus (CHIKV) emerged in the Americas in 2013 and has caused approximately 2.1 million cases and >600 deaths. A retrospective investigation was undertaken to describe clinical, epidemiological, and viral genomic features associated with deaths caused by CHIKV in Ceará state, northeast Brazil.

**Methods.** Sera, cerebrospinal fluid (CSF), and tissue samples from 100 fatal cases with suspected arbovirus infection were tested for CHIKV, dengue virus (DENV), and Zika virus (ZIKV). Clinical, epidemiological, and death reports were obtained for patients with confirmed CHIKV infection. Logistic regression analysis was undertaken to identify independent factors associated with risk of death during CHIKV infection. Phylogenetic analysis was conducted using whole genomes from a subset of cases.

**Results.** Sixty-eight fatal cases had CHIKV infection confirmed by reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (52.9%), viral antigen (41.1%), and/or specific immunoglobulin M (63.2%). Co-detection of CHIKV with DENV was found in 22% of fatal cases, ZIKV in 2.9%, and DENV and ZIKV in 1.5%. A total of 39 CHIKV deaths presented with neurological signs and symptoms, and CHIKV-RNA was found in the CSF of 92.3% of these patients. Fatal outcomes were associated with irreversible multiple organ dysfunction syndrome. Patients with diabetes appear to die at a higher frequency during the subacute phase. Genetic analysis showed circulation of 2 CHIKV East-Central-South African (ECSA) lineages in Ceará and revealed no unique virus genomic mutation associated with fatal outcome.

**Conclusions.** The investigation of the largest cross-sectional cohort of CHIKV deaths to date reveals that CHIKV-ECSA strains can cause death in individuals from both risk and nonrisk groups, including young adults.

**Keywords.** chikungunya virus; *Alphavirus*; arthritogenic; arbovirus; fatal cases.

Chikungunya virus (CHIKV) is an enveloped, single-stranded positive-sense RNA virus that belongs to the *Alphavirus* genus, *Togaviridae* family [1]. It is mainly transmitted to humans by the *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. Most cases are characterized by an acute infection with fever, myalgia, exanthema, and arthralgia lasting up to 3 weeks postinfection [2,

3]. For some CHIKV cases, arthralgia can persist for >3 months, indicating a transition to a chronic stage [2, 3].

In July 2014, the first autochthonous chikungunya cases were reported in Brazil. Genetic analysis revealed the co-circulation of 2 distinct genotypes introduced almost simultaneously in the country. CHIKV Asian genotype was detected in Amapá state, North Brazil and the CHIKV East-Central-South African (ECSA) genotype was first reported in Bahia state, Northeast [4]. Until December 2019, >800 000 CHIKV cases were notified in all regions of Brazil [5].

Between 2013 and 2019, the Pan American Health Organization reported 631 deaths associated with CHIKV infection in South America, likely an underestimation of deaths caused by CHIKV [6]. The highest number of CHIKV-related deaths in the Americas, 214 deaths, was reported in the Ceará state, Northeast Brazil, where an Arbovirus Death Investigation

Received 17 July 2020; accepted 22 July 2020; published online August 7, 2020.

\*S. T. S. L., W. M. S., J. W. C., D. S. C., and M. J. F. contributed equally to this work.

†N. R. F., M. R. T. N., L. P. G. C., and F. M. contributed equally to this work.

Correspondence: W. M. de Souza, Virology Research Center, University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, 14090-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil (wmarciel@usp.br).

Clinical Infectious Diseases® 2020;XX(XX):1-8

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. DOI: 10.1093/cid/ciaa1038

Committee was created due to the high mortality rate and increase of suspected arbovirus-associated deaths [6–8]. This high number of reported fatalities is comparable to what was observed in La Reunion Island [9, 10], where the outbreak was caused by the CHIKV Indian Ocean lineage [11]. In addition, neurologic infections and fatal cases were previously reported during the CHIKV epidemic in 1963–1965 in India [12–14].

Despite their importance for public health management, epidemiological and clinical investigations of fatal cases caused by CHIKV typically focus on case reports [15–21]. Moreover, no information exists on the genetic diversity of CHIKV circulating in Ceará state. This study summarizes the demographic, clinical, laboratorial, and postmortem findings of the largest cross-sectional cohort of CHIKV deaths to date.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Population and Ethics Statement

We selected all fatal cases with clinical suspected arboviral infection and sera, cerebrospinal fluid (CSF), and tissue samples available recorded by the Death Verification Service of State Health Secretariat of Ceará, between December 2016 and October 2017. In each case, autopsies were undertaken within 12 hours postmortem. Sera, CSF, and tissue samples were collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for subsequent investigation. Tissues were also conserved in formalin-fixed blocks, and were sent to Evandro Chagas Institute and the Brazilian Ministry of Health for arboviral histopathological and immunohistochemistry (IHC) analyses. The study was conducted after approval by the ethics committee of the Federal University of Ceará (CAAE number: 85921418.3.0000.5054), Brazil.

### Case Definitions

A suspected fatal case of CHIKV infection was defined as a patient that presented with fever, rash, arthralgia, headache, and/or myalgia during the hospitalization or perimortem period. A confirmed CHIKV death was defined as a suspected fatal case associated with CHIKV infection, plus 1 positive laboratory result for CHIKV either by reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), immunoglobulin M (IgM) detection, and/or IHC [5]. In addition, we defined an acute fatal outcome as a case that lasted up to 20 days, representing the acute disease; and a subacute fatal outcome, as a case that lasted longer than 20 days up to 90 days. Patients with neurologic manifestations (eg, confusion and syncope) and RT-qPCR or IgM detection against CHIKV in CSF were considered to have a central nervous system infection caused by CHIKV [5].

### Laboratory Testing

RNA from CSF and brain tissue was extracted using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) and the ReliaPrep RNA Miniprep Systems (Promega), respectively. Extracted RNA was tested by specific RT-qPCR for CHIKV [22], DENV [23], and

ZIKV [24]. We also tested the postmortem sera and CSF samples using IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for antibody response against CHIKV (Euroimmun), DENV (Serion), and ZIKV (NovaTec Immundiagnostica GmbH). In addition, an ELISA for DENV-NS1 antigens (Bio-Rad Laboratories) was used. We also performed IHC analysis of liver and brain tissue samples of all patients [25].

Based on the laboratory diagnosis from the investigation of fatal cases of CHIKV, complete clinical records were obtained from the laboratory management system (Gerenciador de Ambiente Laboratorial [GAL]). Autopsy records for confirmed CHIKV fatal cases were obtained from the Death Verification Service ([www.saude.ce.gov.br](http://www.saude.ce.gov.br)). Demographic, epidemiological, and clinical data (including comorbidities/immunosuppression history) were extracted from GAL, autopsy records, and home visit reports with the family of patients who died.

### Epidemiological Data

Epidemiological analysis of autochthonous CHIKV cases in Ceará state was undertaken using weekly reports of suspected cases from January to December 2017. Epidemiological reports of cases were obtained from the Brazilian Ministry of Health. Incidences were calculated based on the estimated population of Ceará state in 2017, as reported by the Brazilian Institute of Geography and Statistics ([www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)).

### Statistical Analysis

Descriptive analyses of results are reported as frequencies, arithmetic means, and ranges (when appropriate). The Mann-Whitney *U* test performed in RStudio 1.2.1335 ([www.rstudio.com](http://www.rstudio.com)), was used to compare groups with comorbidities. For the regression analysis, the outcome variable was classified as patients with fatal outcome during the acute or subacute phase of the disease. The most frequent comorbidities in our cohort were used for statistical analysis. To determine comorbidities that may affect the frequency of death during the acute or subacute phase of the disease, we conducted a univariate logistic regression analysis, followed by a multivariable logistic regression controlling for sex and age. *P* values with  $\alpha < .05$  were considered to be significant. Statistical analyses were performed with the Stata version 14 software (StataCorp).

### Viral Genomic Sequencing and Phylogenetic Analysis

Genome sequencing was performed using a targeted multiplex PCR scheme that can amplify both CHIKV genotypes circulating in Brazil [26]. This was followed by Nanopore genome sequencing using the MinION sequencing platform (Oxford Nanopore Technologies) [26]. Preliminary runs showed that all sequences belonged to the same genotype. To improve consensus sequencing coverage, we selected 36 publicly available full genome strains and redesigned CHIKV specific sequencing primers for the genotype identified on preliminary runs by correcting mismatches. Consensus sequences were generated with

a validated bioinformatics pipeline, considering a minimum coverage depth of  $20\times$  [26].

Newly generated CHIKV consensus sequences were aligned to 87 publicly available whole-genome sequences from Brazil using MAFFT version 7.450 [27]. A maximum likelihood (ML) phylogenetic tree was estimated with RAxML version 8 [28] using the GTR+I+ $\gamma$  substitution model [28]. Dated phylogenetic trees were estimated using BEAST version 1.10 under a GTR+I+ $\gamma$  model [29]. We used a strict molecular clock model and a Skygrid tree prior [30] that were previously determined as best-fit models [29]. Evolutionary analyses were run independently in duplicate for 50 million steps, and sampling parameters and trees every 10 000 steps. Maximum clade credibility summary trees were generated using TreeAnnotator version 1.10 [29].

#### Data Availability

Protocols and the new sequencing primers are publicly available at [caddecentre.org/protocols](http://caddecentre.org/protocols). Epidemiological data, phylogenetic trees, XMLs, and Ceará CHIKV genome sequences are available on the DRYAD repository (available on [https://datadryad.org/stash/share/y0p0MC\\_pufbi2DEAelhcOdJDOjFYIud\\_D5s56V-fMC8](https://datadryad.org/stash/share/y0p0MC_pufbi2DEAelhcOdJDOjFYIud_D5s56V-fMC8)). New sequences have been deposited in GenBank with accession numbers MT877206-MT877211.

## RESULTS

In 2017, Ceará state in Brazil experienced a major CHIKV outbreak accounting for 65.7% ( $n = 105\,229/160\,166$ ) of suspected cases in all 27 Brazilian federal states in that year. CHIKV incidence in Ceará state was 1166 suspected cases per 100 000 inhabitants, the highest in the country [31]. Within Ceará, the municipality of Fortaleza (state capital city) accounted for the majority of CHIKV suspected cases ( $n = 61\,825/105\,229$  [58.8%]) (Figure 1A). Moreover, Ceará notified a total of 194 CHIKV-related deaths in 2017 [32]. This corresponds to a case-fatality rate of 1.8 deaths per 1000 cases in 2017. Importantly, Fortaleza city reported the highest number of CHIKV-related deaths ( $n = 144/194$  [74.2%]) in 2017 in Ceará [8]. As expected, CHIKV deaths followed a similar temporal distribution to that of the suspected cases in Ceará, with most cases reported in Fortaleza (Figure 1A and 1B).

We used RT-qPCR, serology, and IHC to ascertain the cause of death of 100 suspected arbovirus fatal cases. A total of 68% (68/100) of the cases were positive for CHIKV by at least 1 diagnostic method (Figure 1C). Of these, 70.6% (48/68) were positive by 2 or more methods. We found that 73.5% (50/68) of deaths were positive for CHIKV only, while 22% (15/68) had viral co-detection with DENV, 2.9% (2/68) co-detection with ZIKV, and 1.5% (1/68) with both DENV and ZIKV. Moreover, CHIKV-RNA was detected in the CSF of 52.9% (36/68) and in the brain of 11.1% (4/36) of the cases. Notably, no DENV or ZIKV RNA was detected in the CSF of CHIKV deaths (Figure 1C).

Figure 2 presents an epidemiological characterization of the 68 CHIKV-confirmed deaths analyzed in this study. CHIKV deaths occurred predominantly in adults aged  $\geq 40$  years ( $n = 42/68$  [61.8%]), with 29.4% (20/68) in middle-aged adults and 32.4% (22/68) in the elderly. The average age was 47.6 years (median, 51 years), ranging from 3 days to 85 years. Most CHIKV deaths occurred in females ( $n = 37/68$  [54.4%]). We also report 5 CHIKV deaths in infants and 5 in children (Figure 2A).

The general clinical manifestations presented by CHIKV deaths were fever ( $n = 44/68$  [64.7%]), arthralgia ( $n = 29/67$  [43.3%]), cardiac symptoms such as cardiac arrest ( $n = 23/67$  [34.3%]), dyspnea ( $n = 23/68$  [33.8%]), diarrhea ( $n = 23/68$  [33.8%]), neurological symptoms such as confusion and syncope ( $n = 17/67$  [25.4%]), headache ( $n = 13/68$  [19.1%]), and renal failure ( $n = 4/68$  [5.9%]) (Figure 2B). The average time between the onset of symptoms and death was 12 days (range, 1–90 days). Out of the 68 CHIKV deaths, 79.4% (54/68) were patients with acute infection with fatality occurring up to 18 days from the onset of symptoms. On the other hand, 16.2% (11/68) of fatal cases were patients with subacute infection. It was not possible to obtain information on the date of symptom onset for 3 patients (4.4%). Of the 36 fatal cases with CHIKV RNA positive in CSF, 3 CHIKV deaths were patients presenting with up to 20 days of infection.

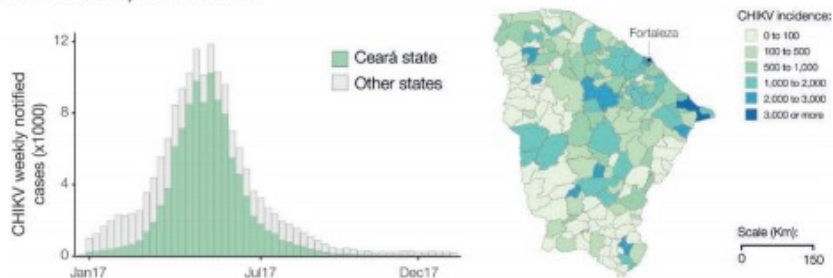
Subsequently, we analyzed comorbidity and immunosuppression records available for 65% (44/68) of CHIKV deaths. No comorbidities were reported in 45.5% (20/44) of the medical records, while 27.3% (12/44) had 1 comorbidity, 25% (11/44) had 2 comorbidities, and only 2.3% (1/44) had 3 comorbidities. The most frequent comorbidities were hypertension in 40.9% (18/44) and diabetes in 15.9% (7/44) of CHIKV deaths (Figure 2D). All patients with diabetes also had hypertension, but only 38.9% (7/18) of patients with hypertension had diabetes.

The average age of CHIKV deaths in people with comorbidities (60 years [range, 31–85 years]) differs from the average age of CHIKV deaths in those without comorbidities (37.4 years [range, 3 days–79 years]) ( $P = .003$ , Mann-Whitney  $U$  test). Multivariable logistic regression analysis, controlled for age and sex, suggests that the risk of dying during the subacute phase of CHIKV infection increases 7 times in cases with diabetes when compared to cases without diabetes (odds ratio, 7.7;  $P = .033$ ; Table 1 and Supplementary Table 1). No statistically significant difference was observed between the days to death of patients with and without comorbidities ( $P = .2855$ , Mann-Whitney  $U$  test). No immunosuppression by cancer, human immunodeficiency virus, or corticosteroid treatment was reported in CHIKV deaths.

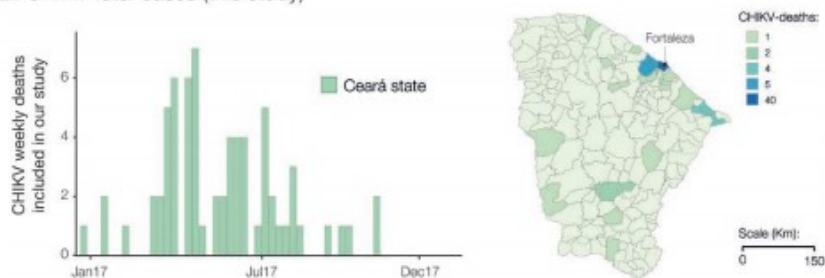
For 42 (61.8%) autopsied CHIKV deaths, heart and/or respiratory failure were the most frequent causes of death (76.2% [32/42]). Autopsies revealed vascular congestion and edema in main organs



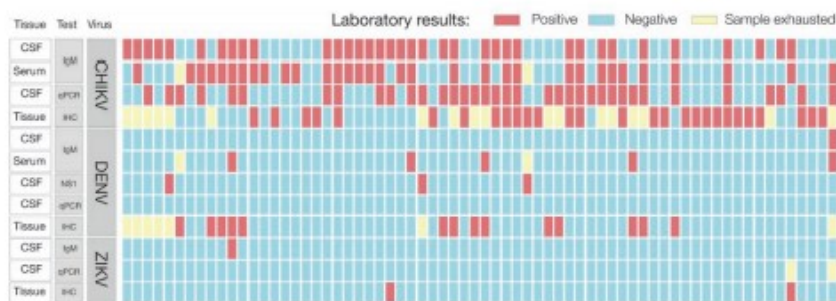
## A. CHIKV suspected cases



## B. CHIKV fatal cases (this study)



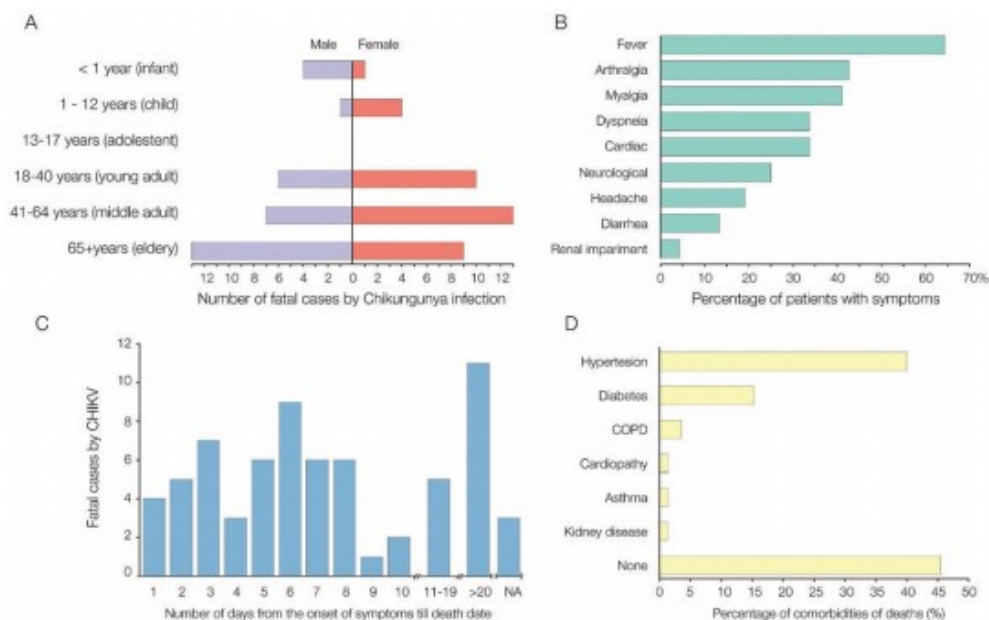
## C. Laboratory results CHIKV-deaths



**Figure 1.** A, Weekly epidemiologic curve of chikungunya cases notified in Ceará state and other Brazilian states, and incidence of chikungunya cases notified by municipalities in Ceará state in 2017. B, Weekly epidemiologic curve and geographical distribution of chikungunya deaths described in this study. C, Diagnosis of 68 Chikungunya deaths described in this study. Abbreviations: CHIKV, chikungunya virus; CSF, cerebrospinal fluid; DENV, dengue virus; IgM, immunoglobulin M; IHC, immunohistochemistry; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; ZIKV, Zika virus.

of CHIKV deaths (Figure 3). Also, CHIKV deaths were frequently associated with hepatitis (58.5% [24/41]), pneumonitis (52.4% [22/42]), myocarditis (36.6% [15/41]), and encephalitis (21.4% [9/42]) (Figure 3 and Supplementary Table 2). Other frequent findings in the lungs were hemorrhage in 57.1% (24/42), 54.8% (23/42) atelectasis, 33.3% (14/42) megakaryocytes, and 26.2% (11/42) hemosiderophages (Supplementary Figure 1).

To elucidate the genetic diversity of CHIKV strains in Ceará, we sequenced the viral genomes from 7 samples recovered from 6 CHIKV deaths (patients 8, 12, 22, and 27 from CSF samples; patient 59 from blood; and patient 4 from CSF and blood). ML and Bayesian phylogenies suggested that sequenced CHIKV strains formed 2 monophyletic clades (1 and 2) with maximum statistical support within the ECSA lineage circulating in Brazil (bootstrap score = 100, posterior



**Figure 2.** Demographics, symptoms, and comorbidities of 68 chikungunya deaths from Ceará state, Brazil. *A*, Age range and sex. *B*, Clinical characteristics. *C*, Days from the onset of symptoms of individuals till death. *D*, Comorbidities associated with chikungunya deaths. Abbreviations: CHIKV, chikungunya virus; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; NA, not available.

support = 1.00). Our analyses suggest that CHIKV was introduced into Ceará state between early 2015 and mid 2016, with the most common ancestor for each cluster at around early to mid-2016 (cluster 1: 2016.60 [95% highest posterior density (HPD), 2016.39–2016.90]; cluster 2 = 2016.84 [95% HPD, 2015.5–2016.83]) (Figure 4). Based on the analysis of the genomes obtained in this study compared to the genomes available, we did not find mutations associated with enhanced infection and transmission in mosquitoes, or increased virulence, and no unique mutations associated with the Ceará sequences.

## DISCUSSION

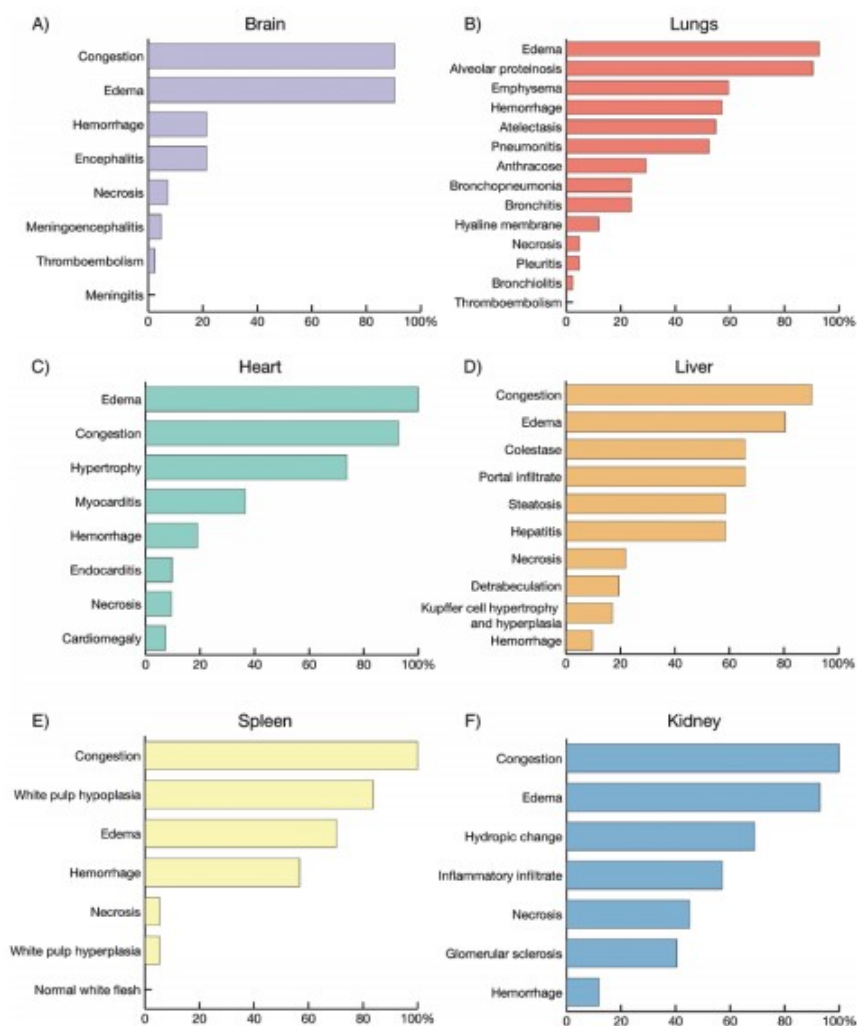
Herein, we perform the most comprehensive characterization with description of clinical, demographic, and laboratory findings of the largest cross-sectional study population of confirmed CHIKV deaths to date. We confirm CHIKV infection in 68 cases and exclude co-detection with ZIKV and/or DENV in 73.5% of them. Although comorbidities and older age play an important role in CHIKV deaths, we show that almost half of fatal cases did not have any comorbidities and that 38.2% (26/68) of them were

**Table 1. Univariate and Multivariable Logistic Regression Analysis of the Presence of Acute or Subacute Fatalities by Chikungunya Infection**

Symptoms	Risk Fatality During Subacute Disease					
	Unadjusted OR	(95% CI)	P Value	Adjusted OR	(95% CI)	P Value
<b>Hypertension</b>						
No	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
Yes	2.77	(.58–13.2)	.200	4.1	(.62–26.9)	.141
<b>Diabetes</b>						
No	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
Yes	6.93	(1.2–40.9)	<b>.033</b>	<b>7.7</b>	(1.2–50.0)	<b>.033</b>
<b>Diabetes and hypertension</b>						
No	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
Yes	1.50	(.20–10.8)	.687	2.48	(.20–29.4)	.472

ψ adjusts by sex (OR, 0.96;  $P = .966$ ) and age (OR, 1.00;  $P = 9.66$ ).

Abbreviations: CI, confidence interval; OR, odds ratio. Results with  $p < 0.05$  are shown in the bold.



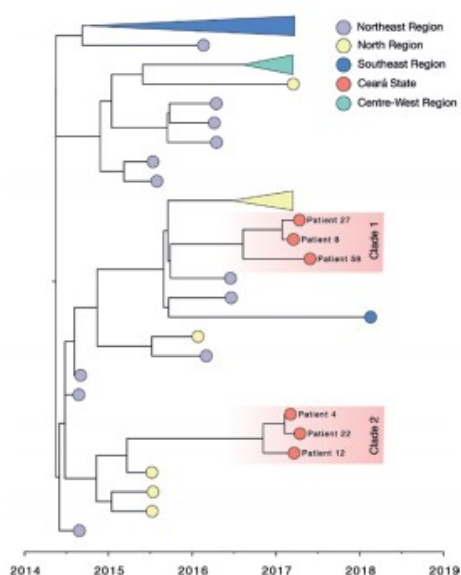
**Figure 3.** A–F, Autopsy findings of 42 chikungunya deaths from Ceará state, Brazil.

aged  $\leq 40$  years. In addition, our autopsy results point to cardiac and respiratory failure, possibly due to generalized congestion and edema as the main death cause in the course of CHIKV infection.

In contrast to other arboviral diseases (eg, DENV and ZIKV), CHIKV infection is symptomatic in most individuals, manifesting as a typical rapid-onset febrile disease, characterized by intense arthralgia, myalgia, headache, and rash [2]. The clinical manifestations described herein for the 68 CHIKV deaths were consistent with previous case reports of typical

CHIKV infections [2]. However, the detection of CHIKV RNA in the CSF of 36 patients and 4 brain samples and the high frequency of neurological symptoms are strongly indicative of a neurotropic role of CHIKV associated with a severe central nervous system infection in more than half of CHIKV-deaths.

CHIKV deaths have only been reported as an outcome of acute infection [15–20]. However, 16.2% of the fatal cases in our study were subacute CHIKV infection, with symptom onset within 25–90 days prior to death, showing that subacute



**Figure 4.** Maximum clade credibility tree of the East-Central-South African genotype of Chikungunya virus in Brazil ( $n = 71$ ), including 6 new sequences from Ceará State. Tips are colored according to the source region of each sample. Clusters from the Southeast, Center-West, and North regions have been collapsed for better visualization. The 2 clusters of sequences from this study were identified as clade 1 and clade 2 based on the earliest estimated time to most recent common ancestor. A molecular clock approach was used for generating the time-rooted tree (see Methods).

CHIKV infections may also have a fatal outcome. These findings are consistent with studies that demonstrate that the peak of excess deaths occurs with a lag of 1 month in relation to reported cases of chikungunya [33]. Subacute CHIKV deaths especially may be underreported as their long-term duration might decrease the idea of an association between a CHIKV diagnosis and a deadly outcome, while increasing the apparent importance of comorbidities or even hospital-acquired infections as the main cause of death [6].

Severe chikungunya infection has been correlated with age dependency and follows a U-shaped parabolic curve [2]. Here, we confirmed that middle-aged adults and the elderly constituted the majority of CHIKV deaths, followed by infants and children, while no fatal cases in adolescents were identified [2]. However, 23.5% of CHIKV deaths occurred in young adults, indicating that deaths by CHIKV infection do occur at young ages more than previously anticipated. Future clinical and epidemiological studies of CHIKV could help to shed light on the risk of infection and disease severity per age class.

Previously reported risk groups for severe chikungunya infection were patients with comorbidities or those immunocompromised [2]. Our results partially support this conclusion, as 54.5% of our cases had at least 1 comorbidity. Notably, we observed that diabetes considerably increases the risk for death in the subacute phase of CHIKV infection. However, 45.5% did not have any comorbidity reported in their medical records. In addition, none of our cases had any medical history of immunosuppression. Collectively, these results suggest that chikungunya infection can lead to patient death even in the absence of an underlying medical condition.

Our autopsy and histopathological analyses suggest that multiple organ dysfunction syndrome in CHIKV infection may occur by hemodynamic disturbance (vascular congestion, edema, and hemorrhage) of main organs, predominately heart and lungs. Also, the presence of hemosiderophages and megakaryocytes within the lungs suggests a role for increasing pressure on alveolar capillaries leading to hemorrhagic complications, as previously described for DENV [34, 35]. Therefore, careful monitoring of fluid balance and administration of hypotonic solutions can be required as part of clinical management.

CHIKV has widely spread throughout Ceará state. Our genetic analysis revealed that virus strains circulating in the state belong to the CHIKV-ECSA genotype introduced in Bahia state in 2014 [4]. We found no amino acid mutations associated with enhanced infection and transmission in mosquito vectors [11].

Our results demonstrated that CHIKV-associated deaths are not a rare event during large outbreaks, and may occur even in low-risk populations (young age and no comorbidities). Thus, the total disease burden must be reevaluated considering these outcomes. Guidelines and diagnoses need to be improved to prevent fatal outcomes in CHIKV-infected patients.

#### Supplementary Data

Supplementary materials are available at *Clinical Infectious Diseases* online. Consisting of data provided by the authors to benefit the reader, the posted materials are not copyrighted and are the sole responsibility of the authors, so questions or comments should be addressed to the corresponding author.

#### Notes

**Author contributions.** S. T. S. L., L. M. S. M., F. M. C. A., I. L. C. R., M. J. M. S., C. P. S. L., R. R. B., and M. P. C. S. performed the RT-qPCR and serological tests. F. K. A. B., D. N. M. B., A. R. S., R. M. A. B. O., C. S. L., M. N. P. M., L. M. E., F. R. F. T., D. R. Q. L., and C. H. M. A. performed the histopathological and immunohistochemistry analysis. W. M. S., D. S. C., and M. J. E. performed viral genome sequencing. R. J., V. S. E., L. H. D., A. L. E. A., and E. L. L. A. provided the epidemiological data. D. S. C. and N. R. F. performed the bioinformatics work and assisted with phylogenetic analyses. D. S. C., J. P. C., and N. R. F. performed the statistical analyses. A. R. R. E., J. L. S. G. V., L. T. M. F., L. P. G. C., and E. M. oversaw parts of the laboratory work. J. P. C., O. G. P., L. T. M. F., M. R. T. N., L. P. G. C., and F. M. contributed to the overall design, interpreted results, and commented on article drafts. W. M. S., D. S. C., M. J. E., S. T. S. L., and N. R. F. wrote the article. W. M. S. led the design and execution of the study and oversaw all analyses and interpretation. All authors have seen and approved the final submitted article.

**Acknowledgments.** The authors thank the staff at the Central Public Health Laboratory of Ceará state, Brazil, for their support and assistance.

with this investigation. We thank Lucy Matkin for logistic support to the CADDE project and proofreading of the text.

**Disclaimer.** The funding sources had no involvement in the study.

**Financial support.** This work was supported by the São Paulo Research Foundation, Brazil (grant numbers 2017/13981-0, 2018/09383-3, 2018/14389-0, 2018/00837-1, and 2019/24251-9); the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (grant number 302584/2015-3, 408338/2018-0); the Clarendon Scholarship; Department of Zoology, University of Oxford; Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP 01/2017-SUS/PPSUS-CEFUNCAPSESA-Decit/SCTIE); Wellcome Trust and Royal Society Sir Henry Dale Fellowship (grant number 204311/Z/16/Z); and the Network of Clinical and Applied Research into Chikungunya through funds from the Department of Science and Technology, Brazilian Ministry of Health.

**Potential conflicts of interest.** The authors: No reported conflicts of interest. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest.

## References

- Chen R, Mukhopadhyay S, Merits A, et al. ICTV virus taxonomy profile: Togaviridae. *J Gen Virol* **2018**; 99:761-2.
- Weaver SC, Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N Engl J Med* **2015**; 372:1231-9.
- Queyriaux B, Simon F, Grandadam M, Michel R, Tolou H, Boutin JP. Clinical burden of chikungunya virus infection. *Lancet Infect Dis* **2008**; 8:2-3.
- Nunes MR, Faria NR, de Vasconcelos JM, et al. Emergence and potential for spread of chikungunya virus in Brazil. *BMC Med* **2015**; 13:102.
- Ministério da Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Brasil. Chikungunya: manejo clínico. Brasília: Ministério da Saúde, **2017**; 65p.
- Lima Neto AS, Sousa GS, Nascimento OJ, Castro MC. Chikungunya-attributable deaths: a neglected outcome of a neglected disease. *PLoS Negl Trop Dis* **2019**; 13:e0007575.
- Cavalcanti LPG, Escossia K, Simião AR, et al. Experience of the arbovirus death investigation committee in Ceará, Brazil, in 2017: advances and challenges. *Epidemiol Serv Saude* **2019**; 28:e2018397.
- Governo do Estado do Ceará. Boletim Epidemiológico: Dengue, Chikungunya e Zika. In: Fortaleza, Brazil: Saúde, **2018**; 13.
- Economopoulou A, Domínguez M, Helynick B, et al. Atypical chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Reunion. *Epidemiol Infect* **2009**; 137:534-41.
- Sissoko D, Malvy D, Ezedine K, et al. Post-epidemic chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. *PLoS Negl Trop Dis* **2009**; 3:e389.
- Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog* **2007**; 3:e201.
- Rao TR, Anderson CR. Concluding review on the papers on the outbreak of febrile illness with haemorrhagic manifestations in Calcutta. *Indian J Med Res* **1964**; 52:727-34.
- Carey DE, Myers RM, DeRanitz CM, Jadhav M, Reuben R. The 1964 chikungunya epidemic at Vellore, South India, including observations on concurrent dengue. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1969**; 63:434-45.
- Rodrigues FM, Patankar MR, Banerjee K, et al. Etiology of the 1965 epidemic of febrile illness in Nagpur city, Maharashtra State, India. *Bull World Health Org* **1972**; 46:173-9.
- Casolari S, Briganti E, Zanotti M, et al. A fatal case of encephalitis associated with chikungunya virus infection. *Scand J Infect Dis* **2008**; 40:995-6.
- Ganesan K, Diwan A, Shankar SK, Desai SB, Sainani GS, Katrak SM. Chikungunya encephalomyeloreticulitis: report of 2 cases with neuroimaging and 1 case with autopsy findings. *AJNR Am J Neuroradiol* **2008**; 29:1636-7.
- Chua HH, Abdul Rashid K, Law WC, et al. A fatal case of chikungunya virus infection with liver involvement. *Med J Malaysia* **2010**; 65:83-4.
- Sam IC, Kamarulzaman A, Ong GS, et al. Chikungunya virus-associated death in Malaysia. *Trop Biomed* **2010**; 27:343-7.
- Hoz JM, Bayona B, Viloria S, Accini JL, Juan-Vergara HS, Viasus D. Fatal cases of chikungunya virus infection in Colombia: diagnostic and treatment challenges. *J Clin Virol* **2015**; 69:27-9.
- Sá PKO, Nunes MM, Leite IR, et al. Chikungunya virus infection with severe neurologic manifestations: report of four fatal cases. *Rev Soc Bras Med Trop* **2017**; 50:265-8.
- Oliveira RMAB, Barreto FKA, Maia AMPC, et al. Maternal and infant death after probable vertical transmission of chikungunya virus in Brazil—case report. *BMC Infect Dis* **2018**; 18:333.
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerg Infect Dis* **2007**; 13:764-7.
- Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol* **2005**; 43:4977-83.
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis* **2008**; 14:1232-9.
- Labadie K, Larcher T, Joubert C, et al. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *J Clin Invest* **2010**; 120:894-906.
- Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, et al. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat Protoc* **2017**; 12:1261-76.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* **2002**; 30:3059-66.
- Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **2014**; 30:1312-3.
- Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ, Rambaut A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol* **2018**; 4:vey016.
- Gill MS, Lemey P, Faria NR, Rambaut A, Shapiro B, Suchard MA. Improving Bayesian population dynamics inference: a coalescent-based model for multiple loci. *Mol Biol Evol* **2013**; 30:713-24.
- Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 50, 2017. Vol. 48. Brasília, Brazil: Ministério da Saúde, **2017**; 12.
- Simião AR, Barreto FKA, Oliveira RMAB, et al. A major chikungunya epidemic with high mortality in northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* **2019**; 52:e20190266.
- Freitas ARR, Donalizio MR, Alarcon-Elbal PM. Excess mortality and causes associated with chikungunya, Puerto Rico, 2014-2015. *Emerg Infect Dis* **2018**; 24:2352-5.
- Vogt MB, Lahon A, Arya RP, Spencer Clinton JL, Rico-Hesse R. Dengue viruses infect human megakaryocytes, with probable clinical consequences. *PLoS Negl Trop Dis* **2019**; 13:e0007837.
- Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis* **2004**; 189:1411-8.

## 2. Artigos Submetidos

Data da Submissão:

Periódico: Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

**Factors associated with Chikungunya infection in a cohort of 15-39 years old women in Fortaleza, Brazil**

**Factors associated with Chikungunya in Brazil**

Francisco Correia<sup>a\*</sup>, Ligia Kerr<sup>a</sup>, Cristiane Frota<sup>a</sup>, Ivana Barreto<sup>c</sup>, Rosa Almeida<sup>a</sup>, Luciano Pamplona<sup>a</sup>, Larissa Araújo<sup>a</sup>, Fábio Myiajima<sup>c</sup>, Shirlene Lima<sup>a,b</sup>, Fernanda Araújo<sup>b</sup>, Leda Simões<sup>b</sup>, Francisco Júnior<sup>a</sup>, Adriano Martins<sup>a</sup>, Livia Dias<sup>a</sup>, Ilka Alcântara<sup>a</sup>, Ana Silva<sup>a</sup>, Carlos Sanhueza<sup>a</sup>, Marco Ribeiro<sup>a</sup>, Maria Teixeira<sup>c</sup>, Anya Meyer<sup>c</sup>, José Júnior<sup>a</sup>, Lucas Vasconcelos<sup>a</sup>, Paulo Sousa<sup>a</sup>, Susy Saraiva<sup>a</sup>, Dawn Wesson<sup>d</sup>, Carl Kendall<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Federal University of Ceará, 1608 Prof. Costa Mendes Street, Didactics Building, 5<sup>th</sup> floor, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Brazil, ZIP CODE 60430-160

<sup>b</sup> Laboratório de Saúde Pública do Estado do Ceará (LACEN). 2405 Barão de Studart Avenue, Dionísio Torres, Fortaleza, Brazil, ZIP CODE 60120-002

<sup>c</sup> Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Branch Ceara, Eusebio, Brazil

<sup>d</sup> Tulane School of Public Health and Tropical Medicine

\* **Correspondent author:** E-mail: gustavcorreia@gmail.com

**Background:** Outbreaks of Chikungunya virus (CHIKV) virus occurred in Brazil between 2015 and 2017. Fortaleza, was one with most cases reported. **Methods:** A cohort of women among 15-39 years old collected baseline information from women in Fortaleza, Brazil in 2018 (*Zika in Fortaleza – ZIF*). We collected sera to detect CHIKV IgG and IgM antibodies. Risk factors for Chikungunya infection were identified through Poisson regression model. **Results:** We evaluated 1,466 serum samples. 13,8% and 37,2% women were found positive

for CHIKV-IgM and IgG antibodies. Living with more than 4 members in the same household and having an abandoned house next to the house were found to be a risk factors for CHIKV. Being currently pregnant was found to be protective for CHIKV infection, which was related to pregnant women used more repellent, inside and outside the home, than non-pregnant women. **Conclusions:** Crowding in household and abandoned houses can increase the mosquito population around the area where families live. Policies providing better living conditions and government care of abandoned buildings are necessary to control the mosquitoes population. Programs addressing free repellent to pregnant women should be extended to the population in the neighborhoods where mosquito control are more complex.

**Keywords:** Chikungunya virus; prevalence; IgM antibodies; IgG antibodies; Brazil; Fortaleza