

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

ESTHER FERREIRA LEÃO NETO

**INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA (CHIKV) EM
INDIVÍDUOS SINTOMÁTICOS NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA-GOIÁS**

GOIÂNIA
2021

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE
GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC nº 1204/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG):


Nome(s) completo(s) do(a)(s) autor(a)(es)(as): Esther Ferreira Leão Neto

Título do trabalho: INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA (CHIKV) EM INDIVÍDUOS SINTOMÁTICOS NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA-GOIÁS.


2. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF do TCCG.


Assinatura(s) do(a)(s) autor(a)(es)(as)

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 20 / 05 / 2021

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à)(s) autor(a)(es)(as) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro.

² As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento. Imagens coladas não serão aceitas.

ESTHER FERREIRA LEÃO NETO

**INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA (CHIKV) EM
INDIVÍDUOS SINTOMÁTICOS NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA-GOIÁS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás como requisito para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dr^a. Fabíola Souza Fiaccadori

GOIÂNIA
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Leão Neto, Esther Ferreira
INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA
(CHIKV) EM INDIVÍDUOS SINTOMÁTICOS NO MUNICÍPIO DE
GOIÂNIA-GOIÁS [manuscrito] / Esther Ferreira Leão Neto. - 2021.
XLII, 41 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Fabíola Souza Fiaccadori.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Farmácia, Goiânia,
2021.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras.

1. vigilância. 2. vírus chikungunya. 3. detecção molecular. 4. RT-PCR
tempo real. I. Fiaccadori, Fabíola Souza, orient. II. Título.

CDU 578

FF
FACULDADE DE
FARMÁCIA



Esther Ferreira Leão Neto

**INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA (CHIKV) EM
INDIVÍDUOS SINTOMÁTICOS NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA-GOÍÁS**

Trabalho de Final de Curso apresentado para a
obtenção de grau de Bacharel em Farmácia à
Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de
Goiás

Data da aprovação: 20/05/2021

Membros da Banca:

Profa. Dr^a. Fabíola Souza Fiaccadori
Orientadora
Biomédica
Universidade Federal de Goiás

Dr^a. Isabela Cinquini Junqueira
Biomédica

Ma. Lucélia Barbosa de Queiróz Silva
Bióloga

Rua 240, esquina com 5ª Avenida,
s/nº - Setor Leste Universitário
CEP 74605-170 - Goiânia - Goiás - Brasil.

Fone: (62) 3209-6044
Site: <http://farmacia.ufg.br>

*Dedico este trabalho à minha família, Dinorá
Ferreira, José Estevo, Esthefany Ferreira e
Gabriel Chiquini.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me permitido vivenciar todas as experiências que culminaram neste momento de minha vida, desde as coisas boas até as ruins, pois todas foram essenciais para que eu conseguisse chegar até aqui, sou muito grata por nunca ter me desamparado nos momentos mais difíceis e também pelas pessoas que colocou no meu caminho, garantindo que eu não caminhasse sozinha.

À minha mãe, Dinorá Ferreira, que mesmo tendo partido antes de eu começar o ensino superior, nos anos em que ficamos juntas me apoiou e ensinou coisas que carrego comigo até hoje. Ao meu pai José Estevo e minha irmã Esthefany Ferreira, por todo o apoio não somente durante o período da graduação, mas pela vida toda, muito obrigada por sempre acreditarem em mim e sonharem junto comigo. Ao Gabriel Chiquini que sempre me incentivou a melhorar e nunca desistir, sou grata por ter percorrido este caminho comigo, estar ao meu lado nos períodos difíceis e me ajudar a superá-los.

Aos colegas de graduação, Nayara e Weverton, obrigada pelos momentos de descontração que vivemos juntos durante este tempo, pelo apoio emocional durante os momentos árduos e por sempre estarem do meu lado. Às colegas do laboratório de virologia, Deborah e Nathania, em especial a Izabela, a quem sou extremamente grata pelos anos de companheirismo, por compartilhar comigo seus conhecimentos, sempre muito cuidadosa e paciente, me ajudando durante toda minha trajetória no laboratório.

À Universidade Federal de Goiás e à Faculdade de Farmácia por me acolherem durante estes cinco anos e por todo aprendizado. Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica, que foi de grande auxílio durante este período. A todos os professores que fizeram parte desta jornada, principalmente a minha orientadora Dr^a. Fabíola Fiaccadori, muito obrigada pela oportunidade de realizar uma iniciação científica e por todos os ensinamentos e auxílio no processo de desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Chikungunya é uma arbovirose transmitida pelos mosquitos do gênero *Aedes*, e tem como agente etiológico o vírus Chikungunya (CHIKV). Podendo ser dividida em fases aguda e crônica, a infecção pelo vírus chikungunya geralmente possui um período de incubação de 2 a 10 dias. Para o diagnóstico laboratorial de CHIKV podem ser utilizados métodos como o isolamento do vírus em cultivo de células, métodos sorológicos e métodos moleculares. Desde a introdução do vírus no Brasil até o ano de 2019, 589.076 prováveis casos foram notificados e 495 mortes confirmadas, em Goiás entre os anos de 2015 e 2020 foram notificados 1591 casos. Este estudo teve como objetivo investigar a ocorrência do vírus chikungunya em população sintomática atendida na rede pública de saúde em Goiânia. As amostras foram coletadas nas unidades de saúde e encaminhadas ao LabViCC. Após extração do RNA viral, foi procedida a investigação molecular por RT-PCR em tempo real. No total foram analisadas 140 amostras, observou-se que todas elas testaram negativo para a presença de CHIKV. Os dados obtidos na presente investigação, reforçam a necessidade de estabelecimento de estratégias de vigilância e monitoramento contínuos, auxiliando na melhor compreensão do papel do CHIKV em nossa região. Estudos como esse são de extrema importância na descrição epidemiológica da doença, principalmente em áreas endêmicas de arboviroses, onde pode ocorrer a circulação simultânea de Zika, Dengue e Chikungunya.

Palavras-chave: vigilância, vírus chikungunya, detecção molecular, RT-PCR tempo real.

ABSTRACT

Chikungunya is an arbovirolosis transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes*, and its etiological agent is the Chikungunya virus (CHIKV). The viral infection can be divided into acute and chronic phases, usually has an incubation period of 2 to 10 days. For laboratory diagnosis of CHIKV, methods such as isolation of the virus in cell culture, serological methods and molecular methods can be used. Since the introduction of the virus in Brazil until 2019, 589,076 probable cases were reported and 495 confirmed deaths, in Goiás between the years 2015 and 2020, 1591 cases were reported. This study aimed to investigate the occurrence of the chikungunya virus in a symptomatic population treated in the public health system in Goiânia. The samples were collected in health units and sent to LabViCC. After extraction of the viral RNA, molecular investigation was performed by RT-PCR in real time. In total 140 samples were analyzed, it was observed that all of them tested negative for the presence of CHIKV. The data obtained in the present investigation reinforce the need to establish strategies for continuous surveillance and monitoring, helping to better understand the role of CHIKV in our region. Studies like this are extremely important in the epidemiological description of the disease, especially in areas endemic to arboviruses, where the simultaneous circulation of Zika, Dengue and Chikungunya can occur.

Key-words: surveillance, chikungunya virus, molecular detection, real-time RT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Figura esquemática representativa da estrutura da partícula viral do CHIKV-----	15
Figura 2: Esquema representativo da organização genômica do CHIKV -----	16
Figura 3 - Esquema representativo da sintomatologia observada em pacientes infectados por CHIKV -----	21
Figura 4 - Fluxograma da metodologia-----	27
Figura 5 - Sintomatologia da população de estudo (N = 140)-----	30
Figura 6 - Casos notificados e confirmados de Chikungunya em residentes em Goiânia, 2014 – 2021-----	32

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1- Características da população de estudo (N = 140)-----30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- C- Proteína do capsídeo
- CEP/UFG- Comitê de Ética em Pesquisa da UFG
- CHIKV- Vírus chikungunya
- DENV- Vírus dengue
- E1- Glicoproteína de envelope 1
- E2- Glicoproteína de envelope 2
- ECSA- Linhagem leste-central-sul africano (*East, Central and South African*)
- EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético
- ELISA- Ensaio de imunoabsorção enzimática
- IgG- Imunoglobulina G
- IgM- Imunoglobulina M
- IOL- Linhagem do Oceano Índico (*Indian Ocean lineage*)
- IPTSP- Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
- J- Região de Junção
- LabViCC- Laboratório de virologia e cultivo celular
- MAYV- Vírus mayaro
- MS- Ministério da Saúde
- nm- Nanômetros
- NTR- Região não traduzida (*non translated region*)
- NSP1- Proteína não estrutural 1 (*non structural protein 1*)
- NSP2- Proteína não estrutural 2 (*non structural protein 2*)
- NSP3- Proteína não estrutural 3 (*non structural protein 3*)
- NSP4- Proteína não estrutural 4 (*non structural protein 4*)
- ORF- Região aberta para leitura (*open reading frame*)
- PCR- Reação em cadeia pela polimerase
- RNA- Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)
- rpm- Rotação por minuto
- RpRd- RNA polimerase RNA dependente
- RT-PCR- Reação em cadeia pela polimerase pós transcrição reversa (*reverse-transcriptase polymerase chain reaction*)
- RT-qPCR- Reação em cadeia pela polimerase pós transcrição reversa em tempo real (*Real Time quantitative PCR*)

SES- Secretaria estadual de saúde

SINAN- Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SMS- Secretaria municipal de saúde

-ssRNA- RNA de fita simples senso negativo

TF- Proteína *TransFrame*

UFG- Universidade Federal de Goiás

WA- Linhagem africano-ocidental (*West African lineage*)

ZIKV- Vírus zika

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 ESTRUTURA E MORFOLOGIA DO CHIKV	14
1.2 VARIABILIDADE	17
1.3 VETOR E CICLO BIOLÓGICO	18
1.4 PATOGENIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	19
1.5 DIAGNÓSTICO	22
1.6 EPIDEMIOLOGIA	23
2. OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. METODOLOGIA	26
4.1 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS	26
4.2 DETECÇÃO VIRAL	27
4.3 ANÁLISE DE DADOS	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

Chikungunya é uma arbovirose transmitida pelos mosquitos do gênero *Aedes*, e tem como agente etiológico o vírus chikungunya (CHIKV) (YACTAYO et al., 2016). O vírus foi isolado pela primeira vez na Tanganica (atualmente Tanzânia), na África em 1953 após um surto da doença entre os anos de 1952 e 1953 (ROSS, 1956; MASON, HADDOW, 1957). Apesar de ter sido isolado apenas no século XX, suspeita-se que a doença esteja presente na África com surtos ocorrendo na Ásia e Américas durante os séculos XVIII e XIX (CAREY, 1971).

Os primeiros casos confirmados de Chikungunya fora da África ocorreram em Bangucoque, na Tailândia em 1958 (HAMMON, HUDNICK, SATHER, 1960). A partir de 1960 muitos países asiáticos e africanos registraram surtos da doença (GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, RAMÍREZ-ARROYO, 2018). Durante o ano de 2004 as autoridades do Quênia identificaram o CHIKV como responsável pela epidemia de uma doença febril que atingiu a região costeira do país, onde se espalhou para as ilhas do Oceano Índico e Índia, resultando em mais de 1 milhão de casos suspeitos (CHRETIEN, LINTHICUM, 2007). A partir de então, o vírus passou a atingir novas regiões, como as Américas e a Europa (GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, RAMÍREZ-ARROYO, 2018).

O primeiro caso confirmado de infecção pelo CHIKV associado à transmissão autóctone no Brasil ocorreu na cidade de Oiapoque, no estado do Amapá em setembro de 2014. Neste mesmo mês, em Feira de Santana, na Bahia, ocorreu um surto da doença, provocado por um genótipo diferente daquele detectado no Amapá (RODRIGUES et al., 2020), a partir de então o vírus se estabeleceu no país (CUNHA, TRINTA, 2017).

1.1 ESTRUTURA E MORFOLOGIA DO CHIKV

O vírus chikungunya está classificado no reino *Orthornavirae*, filo *Kitrinoviricota*, classe *Alsuviricetes*, ordem *Martellivirales*, família *Togaviridae* e gênero *Alphavirus*. Outros arbovírus, como por exemplo o vírus da dengue (DENV) e o zika vírus (ZIKV) também integram o mesmo filo que o CHIKV, embora estejam classificados em outra família. Sendo a família *Togaviridae* composta apenas pelo gênero *Alphavirus*, que por sua vez abriga um total de 31 espécies, sendo o CHIKV e o vírus mayaro (MAYV) as espécies de maior relevância no Brasil (ICTV, 2019; ROMEIRO, 2019).

As partículas virais são compostas por um envelope lipoproteico onde estão inseridas as espículas de glicoproteínas E1 e E2, sendo a bicamada lipídica derivada da membrana plasmática do hospedeiro e enriquecida com colesterol e esfingolípido. O capsídeo de simetria icosaédrica apresenta cerca de 70 nanômetros (nm) de diâmetro e o material genético é constituído por uma única molécula de RNA polaridade positiva (Figura 1). Os componentes proteicos do vírion estão organizados de maneira que formam uma rede icosaédrica, com 240 cópias de cada subunidade. Essas subunidades interagem entre si para formar uma estrutura rígida através da membrana em uma relação de um para um entre a glicoproteína E2 e a proteína do capsídeo (C). Uma outra proteína associada a membrana é a 6K, sendo que a proteína mais recentemente descoberta foi a *TransFrame* (TF), que é encontrada em quantidades estequiométricas no vírion (KUHN, 2013; SANTOS; ROMANO; WIGG, 2015).

Figura 1- Figura esquemática representativa da estrutura da partícula viral do CHIKV

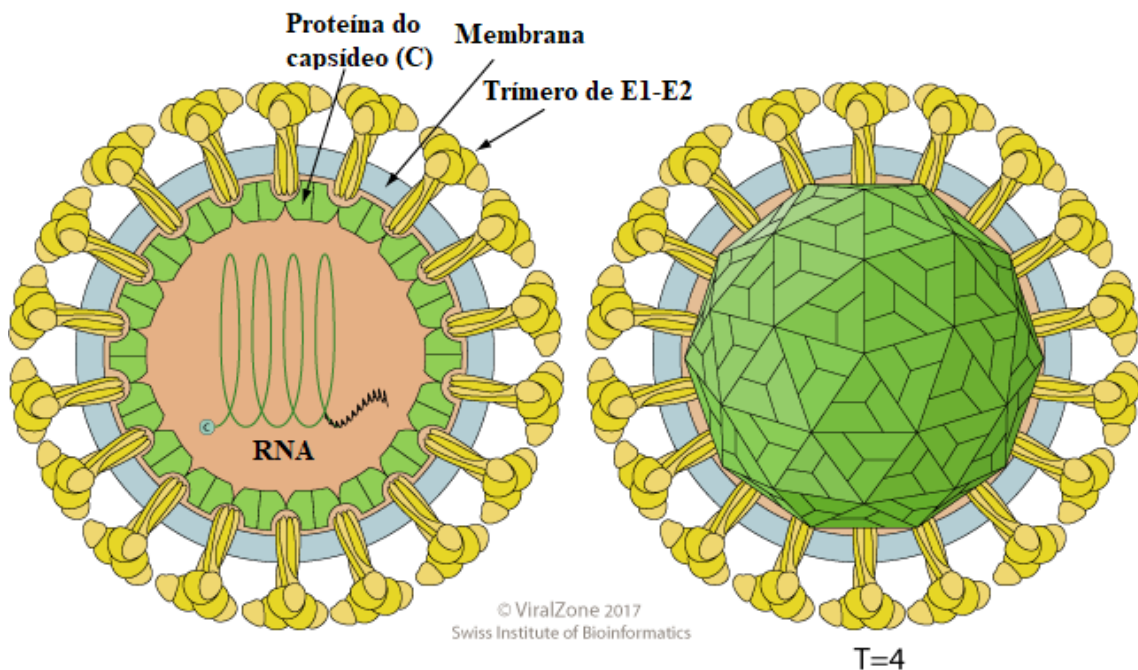


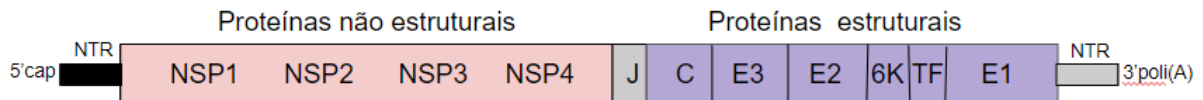
Figura 2

Fonte: ViralZone, 2017 (adaptado)

No genoma do CHIKV, as terminações 5' e 3' do RNA são capeadas e poliadeniladas, respectivamente, possuindo ainda duas regiões de leitura aberta (ORF – *Open Reading Frame*), com uma região de junção (J) e duas regiões não traduzidas (NTR- *non translated region*) com 76 nucleotídeos. Uma poliproteína precursora de quatro proteínas não estruturais (NSP1-NSP4 - *non structural proteins*) é codificada pela ORF contida na terminação 5' traduzida a partir do RNA genômico. A poliproteína precursora das proteínas estruturais, tais

como, proteína de capsídeo (C), as glicoproteínas de envelope (E1 e E2) e os peptídeos denominados E3, 6k e TransFrame (TF) é codificada pela ORF contida na terminação 3', traduzida a partir do RNA subgenômico 26S (SANTOS; ROMANO; WIGG, 2015; KUHN, 2013).

Figura 2 - Esquema representativo da organização genômica do CHIKV



Fonte: SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015 (adaptado)

Formada por 261 aminoácidos a região aminoterminal da proteína C se liga ao genoma, em contrapartida, a região carboxiterminal é mais conservada, interagindo com outras cópias da proteína C, resultando na formação do nucleocapsídeo e na interação com a região citoplasmática da proteína E2 (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009). As proteínas E2 e E3 são resultado da clivagem da glicoproteína pE2 pela enzima furina. Enquanto a E1 e a pE2 são montadas como heterodímeros no retículo endoplasmático, a clivagem da pE2 acontecerá no complexo de Golgi, resultando na formação da E3. Os heterodímeros E1 e E2 são transportados para a membrana plasmática, se agrupando em 80 espículas com trímeros dessas glicoproteínas (WU et al., 2008). A glicoproteína E1 é responsável pela fusão do vírus com a célula do hospedeiro, enquanto a E2 está envolvida no processo de ligação com o receptor e a endocitose. A E3 faz a mediação da montagem das espículas com os trímeros e atua estabilizando a proteína de fusão E1 (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009).

A proteína 6K é incorporada aos vírions em pequenas quantidades e é considerada um componente estrutural necessário nas partículas virais dos *Alphavirus*. A 6K é transportada logo após sua síntese para o sítio de montagem viral na membrana plasmática, sendo importante para o brotamento do vírion, e também funcionando como um sinalizador para a E1 (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009; SANTOS; ROMANO; WIGG, 2015). Em 2008 foi descoberto que o gene 6K é responsável por produzir duas proteínas, a 6K e a *TransFrame*, que é o produto minoritário resultante da mudança de estrutura do gene 6K, funcionando como um falso canal iônico e aumentando a patogenicidade do vírus, além disso, sua expressão impede a síntese de E1 (RAMSEY; MUKHOPADHYAY, 2017; KUHN, 2013).

As proteínas não estruturais são produzidas a partir da poliproteína p1234, que se autocliva em p123 e NSP4 (atua como RNA polimerase RNA dependente- R_pRd), essas duas

proteínas atuam formando um complexo juntamente com cofatores celulares gerando moléculas de RNA genômico negativas. A p123 será clivada em NSP1 e p23, dando origem ao complexo da polimerase, responsável por produzir as fitas de RNA genômico positivas e negativas. A p23 será processada em NSP2 e NSP3, resultando em um complexo da polimerase que produz exclusivamente moléculas de RNA positivas, atuando na replicação do genoma e na transcrição do RNA subgenômico 26S, responsável pela tradução da poliproteína precursora das proteínas estruturais (SANTOS; ROMANO; WIGG, 2015).

A NSP3 atua como um cofator da NSP4, interagindo diretamente com a NSP1, que está envolvida no capeamento do RNA mensageiro viral, essa ação se deve a atividade enzimática da metiltransferase e guanililtransferase, essa proteína também é necessária na síntese de RNA de fita simples senso negativo (-ssRNA) e na ligação do complexo de replicação viral às membranas citoplasmáticas da célula hospedeira (RUPP et al. 2015; SANTOS; ROMANO; WIGG, 2015). A NSP2 é a maior proteína, e suas funções estão relacionadas com sua atuação como nucleosídeo trifosfatase, RNA trifosfatase, RNA helicase e protease para processamento da poliproteína não estrutural. Podendo ser encontrada no citoplasma e núcleo das células infectadas, e não apenas nos complexos de replicação (SANTOS; ROMANO; WIGG, 2015; GARMASHOVA et al. 2006).

1.2 VARIABILIDADE

Através de análises filogenéticas de sequências genômicas localizadas no gene E que codifica a glicoproteína E1 localizada no envelope de cepas da África e Ásia isoladas entre os anos de 1950 e 1960, foi observada a existência de três genótipos distintos de CHIKV. O primeiro contendo todos aqueles de origem africano-ocidental (WA – *West African*), o segundo abrange todos aqueles isolados na Ásia, denominado asiático (*Asian*), e o último, denominado leste-central-sul africano (ECSA - *East, Central and South African*) (SCHUFFENECKER et al., 2006; CHEVILLON et al., 2008).

Em 2004 uma subdivisão da linhagem ECSA do CHIKV surgiu no Quênia, no continente africano, onde se disseminou por outros países banhados pelo Oceano Índico (*Indian Ocean Lineage - IOL*) (TSETSARKIN et al., 2011). Durante a epidemia de 2005-2006 no Oceano Índico, uma análise da microevolução do genoma do CHIKV apontou uma mutação de alanina para valina na posição 226 da glicoproteína de envelope E1 (E1-A226V), as consequências dessa mutação não são claras, porém há hipóteses de que pode ocorrer uma influência no aumento da infecciosidade do vírus nos vetores artrópodes (SCHUFFENECKER

et al., 2006). Estudos anteriores apontaram que uma mutação na mesma posição da E1 sendo responsável pela modulação dos níveis de colesterol na membrana da célula alvo do vírus Semliki Forest, fazendo com que o vírus não mais dependa da presença de colesterol na membrana celular para realizar a fusão (VASHISHTHA et al., 1998).

1.3 VETOR E CICLO BIOLÓGICO

Tratando-se de uma arbovirose, o vírus chikungunya é transmitido pelos mosquitos do gênero *Aedes*. Foram documentados dois ciclos de transmissão, o ciclo enzoótico foi descrito em ambientes florestais na África, onde várias espécies de mosquitos podem atuar como vetores, tais como, *Aedes furcifer*, *Aedes taylori*, *Aedes africanus* e *Aedes luteocephalus* (DIALLO et al., 1999). Com base nas taxas de soroprevalência, os principais hospedeiros no ciclo enzoótico são os primatas não humanos, demonstrando a presença de anticorpos em diversas espécies, como *Pan troglodytes* (Chimpanzé), *Erythrocebus patas* (Macaco vermelho africano), entre outras. (MCINTOSH et al., 1964; WEAVER; CHEN; DIALLO, 2020).

O segundo ciclo de transmissão descrito é o urbano, para se iniciar e sustentar um ciclo de transmissão urbana de CHIKV são necessárias apenas as espécies de mosquitos *Aedes aegypti* e/ou *Aedes albopictus* e hospedeiros humanos para amplificação viral (WEAVER, 2006). Esse ciclo resulta no aumento da exposição humana a transmissão do vírus, principalmente devido a característica urbana desses vetores, outro fator determinante para a alta exposição humana é a preferência das fêmeas adultas em se alimentarem de sangue humano, podendo se alimentar várias vezes por dia durante o período de ovoposição (WEAVER et al., 2012).

O ancestral zoofílico do *Aedes aegypti*, nomeado de *Aedes aegypti formosus* é oriundo da África, sendo geneticamente distinto da espécie doméstica que temos hoje (BROWN et al., 2013). O *Aedes aegypti* mostra-se bem adaptado ao ambiente doméstico, tendo atividade acentuada nos períodos de maior irradiação solar. Uma característica frequente nas fêmeas da espécie é a filia por sangue humano. A estratégia adaptativa de urbanização do mosquito justifica-se pelo fato de o ambiente doméstico ser propício à formação de depósitos artificiais de água, facilitando sua reprodução e deposição de ovos (TAUIL, 2001; COSTA et al, 2009).

Originalmente, o *Aedes albopictus* era uma espécie zoofílica nas florestas da Ásia, tendo se espalhado pelas ilhas dos oceanos Índico e Pacífico, atingindo a Europa, Estados Unidos e Brasil na década de 1980 (CARVALHO; OLIVEIRA. BRAGA, 2014).

Na África, Américas e Ásia, o principal vetor responsável pela transmissão urbana do CHIKV é o *Aedes aegypti*, enquanto que nas ilhas do Oceano Índico e Europa, o vetor encontrado é o *Aedes albopictus* (SAVAGE et al., 2014).

O ciclo é caracterizado por uma fase inicial de incubação intrínseca que ocorre no hospedeiro infectado, variando de um a sete dias. Tem início a fase de viremia, compreendendo o primeiro dia de febre até dois a quatro dias de sintomas, constituindo o período de transmissibilidade. Neste momento, vetores competentes podem se infectar durante a realização do repasto sanguíneo. Após a ingestão do vírus o período de incubação extrínseca no vetor se iniciará, referindo-se ao período entre a infecção do vetor através da alimentação e a capacidade de transmissão do vírus para um hospedeiro susceptível (MATUSALI et al., 2019; HARDY et al., 1983).

O sangue infectado irá alcançar o intestino médio do vetor, onde o CHIKV se ligará nos receptores do epitélio intestinal, ocasionando na infecção dessas células e na replicação viral, resultando na liberação desses novos vírus na hemocele, uma cavidade que integra o sistema circulatório aberto nos invertebrados, onde será disseminado, podendo infectar outros tecidos, incluindo as glândulas salivares. A partir deste momento, quando ocorrer uma replicação viral suficiente o vetor será capaz de infectar um hospedeiro humano susceptível enquanto se alimenta (CARRINGTON; SIMMONS, 2014; MATUSALI et al., 2019).

Uma das formas de se combater as arboviroses se dá através do combate ao vetor, que pode ser feito evitando a formação de depósitos artificiais de água que facilitam a reprodução e deposição dos ovos. Medidas para evitar a formação destes depósitos incluem: tampar recipientes de água que ficam armazenados por um longo período, cobrir garrafas e latas usadas ao coloca-las no lixo e durante os períodos de surtos inseticidas podem ser pulverizados para matar os mosquitos, podendo ser aplicados em superfícies dentro e ao redor de recipientes onde os eles pousam e também podem ser utilizados para matar as larvas imaturas em recipientes com água acumulada (VAIRO et al., 2019).

1.4 PATOGENIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As infecções por alfavírus podem ser subdivididas em dois grupos considerando o quadro clínico, podendo ser associados a quadros de encefalite ou aqueles envolvidos predominantemente com poliartrites e erupção cutânea (POWERS et al., 2001; WEAVER; REISEN, 2010). O CHIKV foi descrito como alfavírus principalmente associado a poliartrite, entretanto, casos onde pacientes desenvolveram meningoencefalite e doença hemorrágica já

foram registrados, apontando que a infecção por CHIKV pode acarretar sequelas graves (GÉRARDIN et al., 2008). Enquanto os alfavírus que comumente causam encefalite infectam os neurônios, o chikungunya infecta células estromais do sistema nervoso central (SCHWARTZ; ALBERT, 2010).

A glicoproteína E2 do CHIKV é responsável por facilitar a entrada do vírus na célula, no entanto, ainda não se sabe quais os receptores celulares cruciais para a entrada do vírus na célula (DUJIL-RICHTER et al., 2015).

Fibroblastos das articulações, pele e células satélites dos músculos são os tecidos mais comumente afetados pela infecção por CHIKV, no entanto, as células endoteliais do fígado, rins, olhos e sistema nervoso central também podem ser comprometidos. Estudos realizados em primatas não humanos demonstraram linfopenia e neutropenia acompanhados do aumento de monócitos e uma resposta pró inflamatória durante a infecção, o mesmo pode ser observado na infecção em humanos. Logo no início da doença, quando ocorre o aumento do título viral, desencadeando a ativação da resposta imune inata, observa-se a produção de interferon tipo 1 (DUJIL-RICHTER et al., 2015; SCHWARTZ; ALBERT, 2010; AKAHATA et al., 2010).

Após a picada do vetor, o vírus se reproduz na região onde a inoculação foi realizada, e através do sistema circulatório irá se disseminar para os órgãos periféricos e células-alvo. O CHIKV, *in vitro*, possui a capacidade de infectar diversas linhagens celulares e células primárias em modelos aderentes, no entanto, não infecta e também não se ligam a linhagens celulares derivadas do sangue, ou em células sanguíneas primárias, tais como linfócitos e células dendríticas (TANABE et al., 2018; SOURISSEAU et al., 2007).

Podendo ser dividida em fases aguda e crônica, a infecção pelo vírus chikungunya geralmente possui um período de incubação de 2 a 10 dias. Durante as duas primeiras semanas a infecção se encontra na fase aguda, e os indivíduos infectados podem se apresentar de forma assintomática ou com a manifestação de sintomas, sendo o mais comumente observado a poliartralgia (87-98% dos casos). Caso a doença evolua para cronicidade, pode ocorrer artralgia afetando múltiplas articulações, podendo se estender por meses ou até anos (TANABE et al., 2018).

Variando de 3,8% a 27,7%, os casos de indivíduos assintomáticos infectados pelo CHIKV são menores do que a maioria das outras arboviroses (THIBERVILLE et al., 2013).

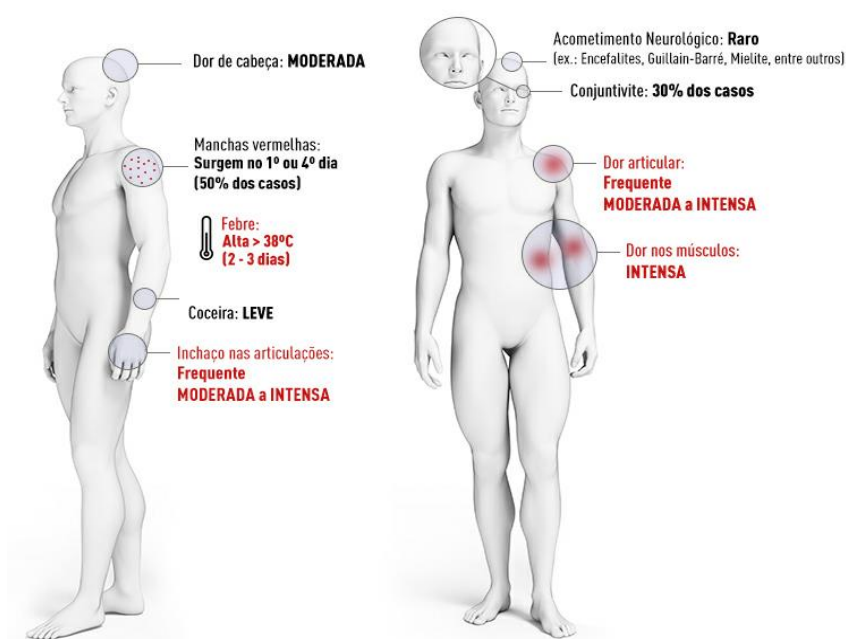
Os sintomas que geralmente são observados durante a fase aguda da infecção por CHIKV são, febre alta, ultrapassando 38,5°C, calafrio, fortes dores nas articulações, dores musculares, exantema, fraqueza e dores de cabeça. Os sintomas tendem a permanecer durante o período de 4 a 7 dias, seguidos de uma recuperação completa do paciente. A poliartralgia

pode ser incapacitante e é caracterizada por fadiga, tenossinovite e artralgia persistente que afeta principalmente tornozelos, pulsos e falanges, tais sintomas tendem a desaparecer em duas semanas (Figura 3). Outros fatores presentes durante a fase aguda são a carga viral elevada, linfopenia e trombocitopenia moderada (THIBERVILLE et al., 2013; SCHWARTZ; ALBERT, 2010; ALLA; COMBE, 2011).

A infecção pode ser denominada como crônica quando as manifestações clínicas se estendem por mais de 3 meses, entretanto, existem relatos em casos clínicos de doença crônica sintomática por anos. Um estudo realizado após surtos de CHIKV na Ilha da Reunião em 2006 e na Itália em 2007, demonstra que 66,5% de um total de 250 pacientes apresentavam sintomas como mialgia, astenia e artralgia que mostraram-se persistentes mesmo após um período de 12 meses após a infecção. (AMARAL; BILSBORROW; SCHOEN, 2020; MORO et al., 2012).

A infecção por Chikungunya pode ser comumente confundida com as infecções por outras arboviroses, como por exemplo dengue e zika devido a semelhança nos sintomas, mas existem algumas diferenças. Na dengue comum observa-se febre maior que 38°C por um período superior a cinco dias, dor intensa nos olhos e na cabeça, dores musculares, falta de apetite e exantema, podendo ocorrer sangramentos na boca, gengivas e nariz nos casos de dengue hemorrágica. A infecção por zika apresenta sintomas como dor de cabeça moderada, coceira intensa, exantema, dor nos ossos e músculos, podendo ser associada a casos de conjuntivite. As dores provocadas pela infecção por CHIKV geralmente são mais intensas, especialmente nas mãos e pés (SES-SC, 2018).

Figura 3 - Esquema representativo da sintomatologia observada em pacientes infectados por CHIKV



Fonte: Ministério da Saúde

1.5 DIAGNÓSTICO

Em função da semelhança da sintomatologia desenvolvida na infecção pelo CHIKV e outros arbovírus como DENV e ZIKV, o diagnóstico laboratorial torna-se determinante. Assim, para o diagnóstico laboratorial de CHIKV podem ser utilizados métodos como o isolamento do vírus em cultivo de células, métodos sorológicos e métodos moleculares (BORGHETTI et al., 2019).

Células Vero ou C6/36 são utilizadas para o isolamento e cultivo de CHIKV, entretanto, considerando o tempo necessário para desenvolvimento e obtenção de resultados, não é uma técnica aplicada em rotina de diagnóstico (LI et al., 2013; DOMINGO et al., 2011; STORCH, 2000).

Os testes sorológicos permitem a detecção de anticorpos de classe M (IgM) ou G (IgG) específicos contra o CHIKV. O ensaio imuno enzimático (ELISA) é o teste sorológico mais comumente utilizado nesse tipo de diagnóstico, embora reatividade cruzada tenha sido descrita em casos de infecções ocasionadas por outras alfavirose, como Vírus O'nyong-nyong e o Vírus Mayaro. A presença de IgM específico para CHIKV indica fase aguda da infecção, podendo ser identificado a partir de seis dias após o início dos sintomas até por volta dos quatro meses. Enquanto a presença de IgG indica que paciente já foi exposto ao vírus, ou encontra-se na fase crônica da doença, esse tipo de anticorpo pode ser detectado por mais de um ano após o início dos sintomas e potencialmente ao longo da vida, conferindo imunidade (NATRAJAN; ROJAS; WAGGONER, 2019; TANABE et al., 2018).

As técnicas moleculares são uma alternativa para o diagnóstico do CHIKV, onde o objetivo é a pesquisa do RNA viral, podendo ser realizado até o sétimo dia após o início dos sintomas, pois após esse período ocorre a queda da viremia, podendo ocasionar em falsos negativos. Podem ser utilizadas técnicas como a reação em cadeia pela polimerase por transcrição reversa (RT-PCR - *reverse-transcriptase polymerase chain reaction*), *nested-PCR* e quando necessário a quantificação da carga viral utiliza-se a Reação em cadeia pela polimerase pós transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR - *Real Time quantitative PCR*) (NATRAJAN; ROJAS; WAGGONER, 2019; TANABE et al., 2018).

Quadros de co-infecções por ZIKV e CHIKV e também por DENV e CHIKV já foram relatadas, o que dificulta o diagnóstico e manejo das arboviroses, principalmente em áreas endêmicas, especialmente quando essas infecções ocasionam em doenças com sintomas semelhantes e sobrepostos, impedindo que o diagnóstico seja realizado apenas com base na análise clínica da sintomatologia, exigindo um diagnóstico diferencial. Sendo os métodos

moleculares amplamente utilizados na área da virologia, pois permitem uma detecção precoce do vírus, não sendo necessário o desenvolvimento de uma resposta imune detectável para confirmação do diagnóstico (SARDI et al., 2016; DUPONT-ROUZEYROL et al., 2015; COLOMBO et al., 2017; HODINKA; KAISER, 2013).

Os protocolos de PCR tempo real possibilitam um diagnóstico mais rápido e específico, pois fornecem uma detecção imediata do ácido nucleico viral, além de possibilitarem uma detecção quantitativa, baixo risco de contaminação, alta sensibilidade e ser de fácil padronização (HALL et al., 2012; WANG et al., 2016).

Os testes moleculares permitem identificar não apenas uma espécie em específico, mas também possibilitam a detecção de membros de gêneros, caso haja a necessidade de uma busca mais ampla. Para detectar integrantes do gênero *Alphavirus* em apenas uma reação, os iniciadores são desenhados utilizando os genes nsP1 e nsP4 como alvo. Em regiões onde a co-circulação de arboviroses é observada, a detecção simultânea de diferentes espécies atua como grande aliado na determinação exata do agente etiológico e monitoramento epidemiológico mais condizente com o cenário da região (ESHOO et al., 2007; GIRY et al., 2017).

1.6 EPIDEMIOLOGIA

Desde o primeiro caso da infecção confirmado nas Américas no ano de 2013 em Saint Martin, uma das ilhas do Mar do Caribe, mais de 2,9 milhões de casos suspeitos de CHIKV e 296 mortes foram reportadas até julho de 2016 em 45 países do continente americano. Devido a possíveis casos de subnotificação, supõe-se que o verdadeiro impacto do Chikungunya seja maior do que o documentado (YACTAYO et al., 2016).

Com a introdução do vírus nas Américas em 2013, os primeiros estados brasileiros a confirmarem casos foram, a Bahia, Amapá, Roraima, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal. Todos os estados do Brasil já tinham casos registrados da doença ao fim de 2016, tendo sido identificadas as linhagens ECSA e Asiática. Desde a introdução do vírus no país até o ano de 2019, 589.076 prováveis casos foram notificados e 495 mortes confirmadas. Os anos onde ocorreram os maiores índices de infecção foram 2016 e 2017, sendo a região nordeste a mais afetada, com maior número de casos e óbitos, onde o Ceará apresentou 61,4% dos casos e 80% dos óbitos de todo o país em 2017. Nos anos de 2018 e 2019, a infecção se concentrou no estado do Rio de Janeiro, sendo a primeira região com focos importantes da doença fora do Nordeste (MS, 2019). Durante o ano de 2020 houveram 82.419 prováveis casos notificados no Brasil, onde as maiores taxas de incidência se concentraram nas regiões Nordeste e Sudeste. Quanto

aos óbitos, trinta casos foram confirmados e 23 mortes ainda seguem em investigação com suspeita de Chikungunya (MS, 2020). Em 2021, até o mês de março, 7.778 casos suspeitos foram notificados em todo país, e neste período, nenhum óbito foi confirmado (MS, 2021).

Um estudo foi desenvolvido por Freitas et al. (2017) com o intuito de avaliar a mortalidade associada com as epidemias de Chikungunya nos estados de Pernambuco, Rio Grande do Norte e Bahia entre os anos de 2015 e 2016, pois o índice de óbitos notificados no Brasil é bem inferior aos relatados por outros países. Foram feitas análises do número de mortes durante os surtos da doença nesses estados, comparado com os períodos sem a epidemia e também em épocas com surtos de dengue. O estado de Pernambuco registrou um excesso de 4.505 óbitos durante as epidemias de CHIKV, podendo essas mortes estarem relacionadas com a infecção.

No estado de Goiás, entre os anos de 2015 e 2020 foram notificados 1156 casos, no entanto, apenas 16 foram confirmados com diagnóstico laboratorial, sendo o ano de 2019 o período com maior notificação, com 395 casos reportados, no entanto, somente 4 foram submetidos a confirmação laboratorial, demonstrando um padrão de subnotificação. Durante o ano de 2020, 709 casos e 1 óbito decorrente da infecção foram notificados na Região Centro-Oeste, destes, 59 casos são do estado de Goiás (MS, 2020; SES-GO, 2020).

O Brasil apresenta diversos fatores que podem influenciar no surgimento de epidemias de CHIKV, tais como, ampla distribuição dos dois principais vetores em todo território nacional, circulação simultânea com outras espécies de arbovírus, maior incidência de casos sintomáticos em relação a dengue, risco de estabelecimento de um ciclo silvestre devido à alta quantidade de espécies de primatas no país, e a dificuldade em realizar uma vigilância epidemiológica devido a extensão territorial do Brasil, o que acaba dificultando também o acesso aos testes laboratoriais de diagnóstico (HONÓRIO et al., 2015).

Investigações a respeito da ocorrência do CHIKV no país ainda são pouco frequentes e em Goiás, informações são escassas, sendo estritas a dados de vigilância em saúde pública. Neste contexto, destaca-se a importância de estudos que contribuam para a construção do conhecimento a respeito do papel do CHIKV na região, bem como a necessidade de investigações de dados epidemiológicos, refletindo no auxílio a elaboração e estabelecimento de planos e estratégias de controle, prevenção e cuidados à saúde por órgãos gestores.

2. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar a ocorrência do vírus Chikungunya em população sintomática atendida na rede pública de saúde em Goiânia-GO.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o perfil da população investigada;
- Determinar a frequência do CHIKV na população de estudo;
- Avaliar a associação entre a positividade viral e as características da população.

4. METODOLOGIA

3.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

O presente estudo se estabeleceu dentro de uma linha de pesquisa que visa o monitoramento de arboviroses no estado de Goiás, desenvolvida pelo Laboratório de Virologia e Cultivo Celular do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (LabViCC/IPTSP/UFG) em parceria com a Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia (SMS), tratando-se de um estudo descritivo para a vigilância virológica em vetores e humanos.

Este projeto foi submetido à avaliação e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG (CEP/UFG – CAAE: 64534017.7.0000.5083), bem como pelo Setor de Ensino e Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia (SMS), sendo desenvolvido segundo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, definidas pela Resolução 466/12.

Foram inclusos no estudo pacientes com quadro febril exantemático até o sétimo dia de sintomas e que tenham sido notificados ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN-Goiás), a partir de atendimento no período entre fevereiro e dezembro de 2019 nas unidades Cais Chácara do governador, UPA- Jardim Itaipu e Cais Jardim Guanabara III da rede pública de saúde de Goiânia.

4.1 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

A coleta de sangue dos pacientes foi realizada nas unidades de saúde por punção venosa por profissionais qualificados da própria equipe das unidades de saúde, utilizando tubos de coleta com volume de 10mL contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético – EDTA.

Na mesma unidade de saúde onde foi realizada a coleta, as amostras de sangue foram processadas e centrifugadas a 1.500 rpm (rotações por minuto) por dez minutos. Logo após a centrifugação, o plasma foi aliquoteado em criotubos devidamente identificados, acondicionados corretamente em botijão de nitrogênio e encaminhadas ao LabViCC/IPTSP/UFG para o adequado armazenamento em ultrafreezer a -80°C até o momento da realização dos testes laboratoriais.

4.2 DETECÇÃO VIRAL

Previamente, a partir das amostras de soro, foi realizada a extração do RNA viral, utilizando o kit comercial *ReliaPrep Viral TNA Miniprep Custom* (Promega, EUA), seguindo instruções do fabricante. Os produtos provenientes da extração foram submetidos à investigação molecular, onde foi realizada uma triagem a partir de RT-qPCR *TaqMan* com uso de protocolo para identificação de regiões genômicas específicas conservadas entre os alfavírus, as amostras que apresentaram positividade foram submetidas a protocolo exclusivo de RT-qPCR para identificação do vírus CHIKV.

O protocolo utilizado para a triagem das amostras foi o descrito por Giry et al. 2017, utilizando iniciadores e sonda para o gene nsP4, tratando-se de uma região conservada para os vírus deste gênero. Para a reação foi utilizado o Kit comercial *Path-IDtm multiplex One-Step RT-qPCR* (Applied Biosystems – Carlsbad, CA, USA). O volume final da reação foi de 10 μ L, e o sistema constituído por 100 nM de cada iniciador, 200 nM de sonda *TaqMan* e água *Nuclease Free*, e a reação foi processada no aparelho Rotor-Gene® Q 5plex HRM System (Qiagen®).

Na segunda etapa, para as amostras que apresentassem positividade na fase de triagem, foi estabelecido e padronizado o protocolo descrito por Patel et al. 2016 com o uso de iniciadores e sonda para região conservada do gene E1 específico para CHIKV, como teste confirmação. Para a reação foi utilizado o Kit comercial *Path-IDtm multiplex One-Step RT-qPCR* (Applied Biosystems – Carlsbad, CA, USA). Os volumes utilizados para realização da reação e o protocolo de ciclagem utilizados nesta fase são os mesmos aplicados na fase de triagem.

Figura 5 - Fluxograma da metodologia



Fonte: autoria própria

4.3 ANÁLISE DE DADOS

Para análise dos dados foram utilizadas informações obtidas a partir da avaliação das fichas de investigação do Sistema de Informação de Agravos. Foi elaborado um arquivo eletrônico contendo os dados provenientes da população de estudo, obtidos pelo banco de dados secundários em cima dos quais foram utilizados para a análise.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo consistiu em uma investigação molecular da ocorrência do vírus chikungunya em Goiânia-Goiás. Durante o período de fevereiro e dezembro do ano de 2019 foram incluídos no estudo 140 indivíduos, atendidos e notificados pela rede pública de saúde do município por apresentarem suspeita clínica de infecção pelos arbovírus circulantes na região. Os pacientes participantes foram atendidos nas unidades de saúde da prefeitura de Goiânia: Cais Chácara do governador, UPA- Jardim Itaipu e Cais Jardim Guanabara III.

Da população total, a maioria pertencia à faixa etária com idade igual ou superior a 50 anos (29,3%) em seguida por indivíduos na faixa etária entre 21 e 30 anos (24,3%). Em relação ao sexo, a maioria era do sexo feminino (57,1%). Considerando o período sintomático, 69,3% das amostras (97/140) foram coletadas quando o paciente se apresentava entre os dias 1 e 3 de sintomas (tabela 1).

Tabela 1: Características da população de estudo (N = 140).

Características	N	%
Faixa etária		
≤ 20 anos	25	17,8
21 – 30 anos	34	24,3
31 – 40 anos	20	14,3
40 – 49 anos	20	14,3
≥ 50 anos	41	29,3
Sexo		
Feminino	80	57,1
Masculino	60	42,9
Período sintomático		
1 – 3 dias	97	69,3
4 – 7 dias	43	30,7

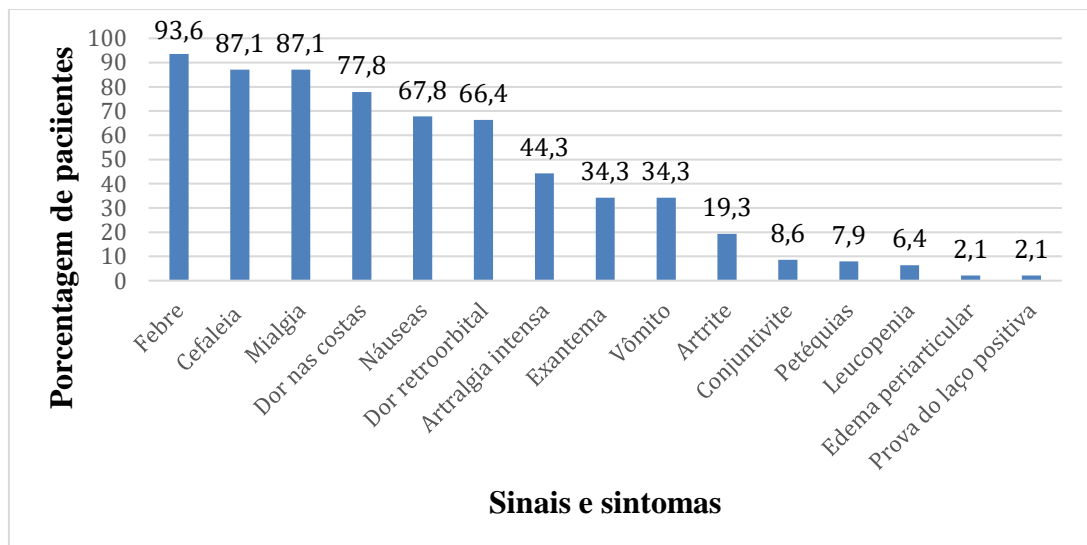
No período entre 2016 e 2018, um estudo epidemiológico para investigar a ocorrência do vírus Chikungunya em pacientes sintomáticos em Goiânia, Goiás, analisou também as características da população estudada, onde a maioria dos pacientes estavam na faixa etária entre os 20 e 29 anos (39,7%) e a faixa dos 15-19 anos integravam a minoria da população (5,2%). Enquanto no presente estudo os integrantes com mais de 50 anos representam a maioria dos participantes (29,3%), outra diferença observada foi na faixa etária dos menores de 20 anos, correspondendo a 17,8%, representando um aumento significativo na procura de atendimento

nas unidades de saúde por pessoas nesta faixa etária. Quanto ao sexo, 85,5% eram do sexo feminino, enquanto neste trabalho não houve diferença na distribuição em relação ao sexo, o que pode demonstrar uma mudança no perfil da população sintomática em Goiânia no ano de 2019 (MORAIS, 2019).

Em relação a sintomatologia, a febre foi o sintoma mais relatado, sendo observada em 93,6% (131/140) dos pacientes. Mialgia e cefaleia também se destacaram entre as manifestações clínicas descritas, sendo ambas relatadas por 87,1% (122/140) dos participantes. Náuseas, dores nas costas e retroorbital também foram observadas em grande parte da população investigada, estando presentes em 67,8% (95/140), 77,8% (109/140) e 66,4% (93/140) dos integrantes, respectivamente. O exantema e a artralgia intensa foram relatados por 34,3% (48/140) e 44,3% (62/140) dos participantes. Entre sinais menos prevalentes observa-se o edema periarticular e a prova do laço positiva, representando apenas 2,1% (3/140) dos relatos (figura 5).

Segundo levantamento da Secretaria Municipal de Goiânia (SMS) em 2019, os sintomas mais comumente relatados por pacientes com a infecção por CHIKV são: Febre de início súbito maior que 38,5°C e dor intensa nas articulações (artralgia) e artrite intensa, de início agudo. Estando de acordo com os sintomas observados neste estudo, onde febre e artralgia foram descritos por uma grande porcentagem dos pacientes. Entretanto, conforme descrito anteriormente, esses são sintomas também frequentes em outras arboviroses circulantes na região como dengue e zika, confirmando a necessidade de realização de testes laboratoriais para a identificação agente associado à infecção.

Figura 5 - Sintomatologia da população de estudo (N = 140)



Fonte: autoria própria

Para a realização deste estudo foram padronizados dois protocolos de RT-qPCR, uma para detecção de alfavírus e outro para identificação específica do CHIKV, a ser utilizado nas amostras que apresentassem positividade na reação para alfavírus.

As amostras foram submetidas ao protocolo RT-qPCR para detecção de alfavírus, conforme descrição. Em todos os protocolos realizados foram utilizados controles positivo e negativo para CHIKV para validação das reações realizadas. A partir das 140 amostras analisadas, em nenhuma foi observada positividade para este protocolo, razão pela qual nenhuma amostra foi submetida a reação de RT-qPCR de identificação para CHIKV.

Os dados encontrados estão em acordo a estudo semelhante realizado em Rondônia, Brasil, a partir de 164 casos agudos exantemáticos investigados por RT-qPCR, o qual demonstrou serem todas as amostras analisadas negativas para CHIKV (VIEIRA et al., 2019). Outro estudo, realizado em pacientes do Mato Grosso durante os anos de 2015 e 2016 apresentou positividade de 0,4% para CHIKV, e o genótipo identificado foi o ECSA (DE SOUZA COSTA, 2019).

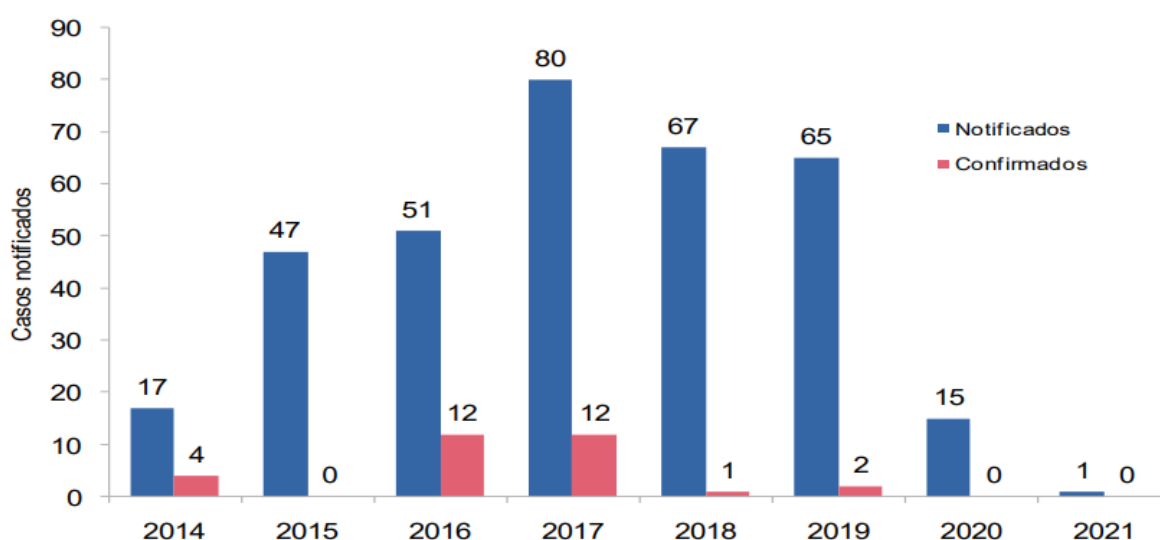
A nível mundial, os resultados encontrados estão de acordo com os dados obtidos por um estudo realizado por Chipwaza et al. (2020) na Tanzânia, África, onde foram incluídos 294 indivíduos sintomáticos, onde observou-se um índice de positividade de 1% (3/294). Um levantamento dos casos submetidos a testes de diagnóstico laboratorial na Índia entre os anos de 2016 e 2018 foi realizado por Murhekar et al. (2019) obteve um índice de positividade de 20,5% de um total de 49.380 casos investigados, destoando dos dados obtidos no presente trabalho.

Uma investigação para avaliar a exposição ao vírus chikungunya em indivíduos sintomáticos atendidos pela rede pública de saúde em Goiânia, Goiás nos anos de 2016 e 2018 foi realizada através da pesquisa de anticorpos específicos de classe IgG, observando-se uma positividade de 2,3% (4/174), sendo que 3 desses casos positivos foram de pacientes que procuraram atendimento em 2018 (MORAIS, 2019; SMS, 2020). O baixo percentual de exposição ao CHIKV observado na mesma região, demonstra a baixa frequência deste agente, refletindo o resultado observado no presente estudo.

Desde a introdução do CHIKV no Brasil, embora o destaque da região Centro-Oeste como a segunda região com maior percentual de casos notificados no ano de 2018, no estado de Goiás, após a identificação do primeiro caso autóctone de infecção pelo vírus CHIKV no município de Rio Quente, observou-se um pequeno número de registros, quando comparados a outras regiões do país. Assim, o perfil epidemiológico desta infecção no estado de Goiás demonstra uma baixa circulação deste agente (MS, 2019; SES-GO, 2020; SMS, 2020).

Corroborando os achados do presente estudo, na cidade de Goiânia-GO no ano de 2019 foram notificados no total 65 casos suspeitos de infecção por CHIKV, tendo sido apenas dois destes confirmados por testes laboratoriais, apresentando uma diminuição no número de casos quando comparada com os dois anos anteriores (figura 6) (SMS, 2021). Ademais, a amostragem ocorreu ao longo do ano de 2019, o que pode ter refletido na coleta de amostras em períodos de baixa endemicidade.

Figura 6- Casos notificados e confirmados de Chikungunya em residentes em Goiânia, 2014 - 2021



Fonte: Secretaria municipal de saúde, Goiânia, Goiás

A drástica queda no número de casos notificados em Goiás entre os anos de 2019 e 2020 ocorreu coincidentemente no período onde as ações de saúde do país foram intensificadas para o combate da COVID-19, sugerindo uma possível subnotificação num período em que era esperado o aumento sazonal de casos de arboviroses no Brasil (SMS, 2021).

Os primeiros casos de Chikungunya no Brasil foram notificados nos estados da Bahia e Amapá, entretanto, logo todos os estados do país já haviam relatado casos da doença, onde o período de maior endemicidade ocorreu entre os anos de 2014 e 2016. Embora o vírus tenha se dispersado por todo o país, esta ocorreu em uma escala menor do que a esperada, tendo em vista o padrão observado em outros países, principalmente os da América Central e Caribe (SILVA et al., 2018).

Embora a doença provocada pela infecção por CHIKV resulte em uma imunidade persistente, ao contrário de outras arboviroses como a dengue que possui quatro sorotipos, outros desafios são impostos ao sistema de saúde, em decorrência das altas taxas de ataque e cronificação, ocorrendo uma sobrecarga de serviços e absenteísmo laboral, tendo em vista que

o paciente em fase crônica pode não conseguir trabalhar devido as dores provocadas pela doença. Outro aspecto importante a ser considerado, são as formas atípicas da doença, que dificultam o manejo e o diagnóstico dos casos, podendo aumentar o número de óbitos. Reforçando que as ações de vigilância e controle de chikungunya devem ser intensificadas mesmo em períodos de baixa endemicidade, com o intuito de reduzir a magnitude da doença (MS, 2019)

6. CONCLUSÃO

A presente investigação permitiu avaliar a ocorrência do CHIKV em pacientes sintomáticos das unidades da rede pública de Goiânia, Goiás, durante ano de 2019. Devido ao pequeno número de casos submetidos a testes de diagnósticos laboratoriais, estudos como esse são de extrema importância na descrição epidemiológica da doença, principalmente em áreas endêmicas de arboviroses, onde pode ocorrer a circulação simultânea desses agentes, como Zika, Dengue e Chikungunya.

A vigilância virológica contribui para o monitoramento do CHIKV e fornece dados que podem agregar à vigilância epidemiológica na cidade, alertando as autoridades sobre possíveis epidemias e auxiliando na implantação de medidas de controle. Assim, os dados obtidos na presente investigação, reforçam a necessidade de estabelecimento de estratégias de vigilância e monitoramento contínuos, auxiliando na melhor compreensão do papel do CHIKV em nossa região e colaborando com outros serviços de vigilância já estabelecidos, aprimorando o manejo da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAHATA, W. et al. A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. **Nature medicine**, v. 16, n. 3, p. 334-338, 2010.
- ALLA, S. A.; COMBE, B. Arthritis after infection with Chikungunya virus. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 25, n. 3, p. 337-346, 2011.
- AMARAL, J. K.; BILSBORROW, J. B.; SCHOEN, R. T. Chronic Chikungunya arthritis and rheumatoid arthritis: what they have in common. **The American journal of medicine**, v. 133, n. 3, p. 91-97, 2020.
- BORGHETTI, I. A. et al. External control viral-like particle construction for detection of emergent arboviruses by real-time reverse-transcription PCR. **BioMed research international**, v. 2019, 2019.
- BROWN, J. E. et al. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. **Evolution**, v. 68, n. 2, p. 514-525, 2014.
- CAREY, D. E. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity?. **Journal of the history of medicine and allied sciences**, v. 26, n. 3, p. 243-262, 1971.
- CARRINGTON, L. B.; SIMMONS, C. P. Human to mosquito transmission of dengue viruses. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 290, 2014.
- CARVALHO, R. G.; OLIVEIRA, R. I.; BRAGA, I. A.. Updating the Geographical Distribution and Frequency of *Aedes Albopictus* in Brazil With Remarks Regarding Its Range in the Americas. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 787-796, 2014.
- CHEVILLON, C. et al. The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 2, p. 80-88, 2008.
- CHRETIEN, J. P.; LINTHICUM, K. J. Chikungunya in Europe: what's next?. **Lancet**, 2007.
- CHIPWAZA, Beatrice et al. Occurrence of 4 dengue virus serotypes and chikungunya virus in Kilombero Valley, Tanzania, during the dengue outbreak in 2018. **In: Open forum infectious diseases. US: Oxford University Press**, 2021. p. 626.
- COLOMBO, T. E. et al. Clinical, laboratory and virological data from suspected ZIKV patients in an endemic arbovirus area. **Journal of Clinical Virology**, v. 96, p. 20-25, 2017.
- COSTA, C. A.; SANTOS, I. G.; BARBOSA, M. G. Detecção e tipagem de vírus dengue em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) na Cidade de Manaus, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 677-681, 2009.
- CUNHA, R. V.; TRINTA, K. S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment-A Review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, p. 523-531, 2017.

DE SOUZA COSTA, M. C. et al. Arbovirus investigation in patients from Mato Grosso during Zika and Chikungunya virus introduction in Brazil, 2015–2016. **Acta tropica**, v. 190, p. 395-402, 2019.

DIALLO, M. et al. Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 60, n. 2, p. 281-286, 1999.

DOMINGO, C. et al. Molecular diagnosis of flaviviruses. **Future Virology**, v. 6, n. 9, p. 1059-1074, 2011.

DUIJL-RICHTER, V. et al. Early events in chikungunya virus infection—from virus cellbinding to membrane fusion. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3647-3674, 2015.

DUPONT-ROUZEYROL, M. et al. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 2, p. 381, 2015.

ESHOO, M. W. et al. Direct broad-range detection of alphaviruses in mosquito extracts. **Virology**, v. 368, n. 2, p. 286-295, 2007.

FREITAS, A. R. R. et al. Excess Mortality Related to Chikungunya Epidemics in the Context of Co-circulation of Other Arboviruses in Brazil. **Plos Currents**, v. 9, p. 140491, 2017.

GARMASHOVA, N. et al. Sindbis virus nonstructural protein nsP2 is cytotoxic and inhibits cellular transcription. **Journal of virology**, v. 80, n. 12, p. 5686-5696, 2006.

GÉRARDIN, P. et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Reunion. **PLoS medicine**, v. 5, n. 3, p. 60, 2008.

GIRY, C. et al. Improved detection of genus-specific Alphavirus using a generic TaqMan® assay. **BMC microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1-9, 2017.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, J. A.; RAMÍREZ-ARROYO, G. F. Chikungunya virus: History, geographic distribution, clinical picture, and treatment. **Puerto Rico health sciences journal**, v. 37, n. 4, p. 187-194, 2018.

GOVERNO DE SANTA CATARINA SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE (SES-SC). **CONHEÇA OS SINTOMAS DA DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA**. Disponível em: <https://www.saude.sc.gov.br/index.php/noticias-geral/todas-as-noticias/1629-noticias-2018/10454-conheca-os-sintomas-da-dengue-zika-e-chikungunya>. Acesso em: 18 jul. 2020.

HALL, R. A. et al. Advances in arbovirus surveillance, detection and diagnosis. **Journal of biomedicine and biotechnology**, v. 2012, 2012.

HAMMON, W. M.; RUNDNICK, A.; SATHER, G. E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. **Science**, v. 131, n. 3407, p. 1102-1103, 1960.

HARDY, J. L. et al. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. **Annual review of entomology**, v. 28, n. 1, p. 229-262, 1983.

HODINKA, R. L.; KAISER, L. Point-counterpoint: is the era of viral culture over in the clinical microbiology laboratory?. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 1, p. 2-8, 2013.

HONÓRIO, N. A. et al. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cadernos de saude publica**, v. 31, p. 906-908, 2015.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). **ICTV Taxonomy history: Chikungunya virus**. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=201905087. Acesso em: 1 ago. 2020.

JOSE, J.; SNYDER, J. E.; KUHN, R. J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. **Future microbiology**, v. 4, n. 7, p. 837-856, 2009.

KUHN, R. J. Togaviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; COHEN, J. I. **Fields Virology**. 6. ed. [S.l.: s.n.], 2013. p. 629-650.

LI, Y. G. et al. Chikungunya virus induces a more moderate cytopathic effect in mosquito cells than in mammalian cells. **Intervirolgy**, v. 56, n. 1, p. 6-12, 2013.

MASON, P. J.; HADDOW, A. J. An Epidemic of Yirus Disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. An Additional Note on Chikungunya Yirus Isolations and Serum Antibodies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 3, p. 238-40, 1957.

MATUSALI, G. et al. Tropism of the chikungunya virus. **Viruses**, v. 11, n. 2, p. 175, 2019.

MCINTOSH, B. M. et al. Further Studies on the Chikungunya Outbreak in Southern Rhodesia in 1962: I.—Mosquitoes, Wild Primates and Birds in Relation to the Epidemic. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 58, n. 1, p. 45-51, 1964.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Chikungunya: causas, sintomas, tratamento e prevenção**. Disponível em: <http://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/chikungunya>. Acesso em: 28 mar. 2021.

MORAIS, P. H. **Avaliação da exposição ao vírus chikungunya em população de Goiânia-Goiás**. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro) - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás. Goiás. 2019.

MORO, M. L. et al. Long-term chikungunya infection clinical manifestations after an outbreak in Italy: a prognostic cohort study. **Journal of Infection**, v. 65, n. 2, p. 165-172, 2012.

MURHEKAR, M. et al. Epidemiology of chikungunya based on laboratory surveillance data—India, 2016–2018. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 113, n. 5, p. 259-262, 2019.

NATRAJAN, M. S.; ROJAS, A.; WAGGONER, J. J. Beyond fever and pain: diagnostic methods for chikungunya virus. **Journal of clinical microbiology**, v. 57, n. 6, 2019.

PATEL, P. et al. A field-deployable reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of the chikungunya virus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 9, p. 0004953, 2016.

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

RAMSEY, J.; MUKHOPADHYAY, S. Disentangling the frames, the state of research on the alphavirus 6K and TF proteins. **Viruses**, v. 9, n. 8, p. 228, 2017.

RODRIGUES, A. M. et al. Genomic surveillance of the Chikungunya Virus (CHIKV) in Northeast Brazil after the first outbreak in 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.

ROMEIRO, M. F. **Estudo sobre infecções por Alphavirus e Flavivirus em amostras de banco de sangue**. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019. doi:10.11606/T.17.2020.tde-17122019-142443. Acesso em: 23 mai. 2021.

ROSS, R. W. The Newala epidemic: III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **Epidemiology & Infection**, v. 54, n. 2, p. 177-191, 1956.

RUPP, J. C. et al. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. **The Journal of general virology**, v. 96, n. 9, p. 2483, 2015.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Virologia humana**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan LTDA, 2015. p. 810-827.

SARDI, S. I. et al. Coinfections of Zika and Chikungunya viruses in Bahia, Brazil, identified by metagenomic next-generation sequencing. **Journal of clinical microbiology**, v. 54, n. 9, p. 2348-2353, 2016.

SAVAGE, H. M. et al. Incrimination of *Aedes (Stegomyia) hensilli* Farner as an epidemic vector of Chikungunya virus on Yap Island, Federated States of Micronesia, 2013. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 92, n. 2, p. 429-436, 2015.

SCHUFFENECKER, I. et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. **PLoS Med**, v. 3, n. 7, p. e263, 2006.

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

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes Aegypti* (dengue, chikungunya e zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 10, 2021**. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/marco/23/boletim_epidemiologico_svs_10.pdf. Acesso em: 24 mar. 2021.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes Aegypti (dengue, chikungunya e zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 53, 2020.** Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/28/boletim_epidemiologico_svs_51.pdf. Acesso em: 24 mar. 2021.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Vigilância em Saúde no Brasil 2003-2019.** Disponível em: <https://www.ghc.com.br/files/boletim-especial-21ago19-web.pdf>. Acesso em: 31 mar. 2021.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DE GOIÁS (SES-GO). **Boletim epidemiológico.** Disponível em: <https://extranet.saude.go.gov.br/public/aedes.html>. Acesso em: 27 fev. 2021.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE (SMS). **Monitoramento dos casos de Arboviroses Urbanas Transmitidas pelo Aedes (Dengue, Chikungunya, Zika e Microcefalia), ano 2019.** Disponível em: https://saude.goiania.go.gov.br/wp-uploads/sites/3/2020/05/Informe_Semanal_Den_Chik_Zika_FA_27_12_19_SE_52_03_01_20.pdf. Acesso em: 11 abr. 2021.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE (SMS). **Monitoramento dos casos de Arboviroses Urbanas Transmitidas pelo Aedes (Dengue, Chikungunya, Zika e Microcefalia), ano 2020.** Disponível em: <https://saude.goiania.go.gov.br/informe-dengue-chikungunya-zika-e-microcefalia/informe-dengue-2020/>. Acesso em: 04 abr. 2021.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE (SMS). **Monitoramento dos casos de Arboviroses Urbanas Transmitidas pelo Aedes (Dengue, Chikungunya, Zika e Microcefalia), ano 2021.** Disponível em: <https://saude.goiania.go.gov.br/informe-dengue-chikungunya-zika-e-microcefalia/informe-dengue-2021-2/>. Acesso em: 11 abr. 2021.

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

SOURISSEAU, M. et al. Characterization of reemerging chikungunya virus. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 6, p. 89, 2007.

STORCH, G. A. Diagnostic virology. **Clinical infectious diseases**, v. 31, n. 3, p. 739-751, 2000.

TANABE, I. S. et al. Cellular and molecular immune response to chikungunya virus infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 345, 2018.

TAUIL, Pedro Luiz. Urbanização e ecologia do dengue. **Caderno de saúde pública**, v. 17, p. 99-102, 2001.

TEIXEIRA, M. G. et al. East/central/South African genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 5, p. 906, 2015.

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

TSETSARKIN, K. A. et al. Chikungunya virus emergence is constrained in Asia by lineage-specific adaptive landscapes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 19, p. 7872-7877, 2011.

VAIRO, F. et al. Chikungunya: epidemiology, pathogenesis, clinical features, management, and prevention. **Infectious Disease Clinics**, v. 33, n. 4, p. 1003-1025, 2019.

VASHISHTHA, M. et al. A single point mutation controls the cholesterol dependence of Semliki Forest virus entry and exit. **The Journal of cell biology**, v. 140, n. 1, p. 91-99, 1998.

VIEIRA, D. S. et al. Epidemiological profile of Zika, Dengue and Chikungunya virus infections identified by medical and molecular evaluations in Rondonia, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 61, 2019.

VIRALZONE. **Alphavirus**. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/625>. Acesso em: 21 abr. 2020.

WANG, S. M. et al. Detection and Quantification of Chikungunya Virus by Real-Time RT-PCR Assay. **Methods in molecular biology (Clifton, NJ)**, v. 1426, p. 105-117, 2016.

WEAVER, S. C. et al. Chikungunya virus and prospects for a vaccine. **Expert review of vaccines**, v. 11, n. 9, p. 1087-1101, 2012.

WEAVER, S. C. Evolutionary influences in arboviral disease. **Quasispecies: concept and implications for virology**, p. 285-314, 2006.

WEAVER, S. C.; CHEN, R.; DIALLO, M. Chikungunya virus: role of vectors in emergence from enzootic cycles. **Annual review of entomology**, v. 65, p. 313-332, 2020.

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

WU, S. R. et al. The dynamic envelope of a fusion class II virus: E3 domain of glycoprotein E2 precursor in semliki forest virus provides a unique contact with the fusion protein E1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 39, p. 26452-26460, 2008.

YACTAYO, S. et al. Epidemiology of Chikungunya in the Americas. **The Journal of infectious diseases**, v. 214, n. 5, p. S441-S445, 2016.