



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS



Dissertação de Mestrado

APERFEIÇOAMENTO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR
PARA VIGILÂNCIA DAS INFECÇÕES DE CHIKV NO
ESTADO DA BAHIA

Láís Cambuí Gusmão

Salvador (Bahia), 2022

Ficha catalográfica
Bibliotheca Gonçalo Moniz
Sistema Universitário de Bibliotecas
Universidade Federal da Bahia

Gusmão, Laís Cambuí.

G982 Aperfeiçoamento do diagnóstico molecular para vigilância das infecções de
CHIKV no Estado da Bahia / Laís Cambuí Gusmão. – 2022.

75 f. il.

Inclui anexos.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Khouri
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde,
Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2022.

1. Chikungunya - Bahia. 2. Dengue – Bahia. 3. Vírus da Zika - Bahia.
4. Diagnóstico molecular. 5. Arbovírus – Bahia. I. Cunha, Ricardo Khouri. II.
Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia. IV. Título.

CDU (2007): 616.91



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS



LAÍS CAMBUÍ GUSMÃO

Aperfeiçoamento do diagnóstico molecular para vigilância das infecções de CHIKV no estado da Bahia.

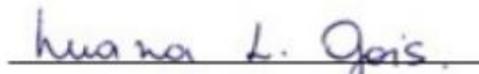
Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em: 29/04/2022

Banca Examinadora



Prof. Dr. Antônio Ricardo Khouri Cunha
Doutor em Patologia Experimental Humana/FIOCRUZ-UFBA
Professor Adjunto UFBA (Presidente/Orientador)



Profa. Dra. Luana Leandro Gois
Doutora em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa/IGM-FIOCRUZ
Professora Adjunto UFBA



Profa. Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes
Doutora em Patologia Humana/UFBA
Pesquisadora FIOCRUZ



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE



APERFEIÇOAMENTO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR
PARA VIGILÂNCIA DAS INFECÇÕES DE CHIKV NO
ESTADO DA BAHIA

Laís Cambuí Gusmão

Orientador: Ricardo Khouri

Dissertação apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Salvador (Bahia), 2022

COMISSAO EXAMINADORA

Membros Titulares:

- Prof. DSc. Ricardo Khouri Cunha. Doutor em Patologia Experimental Humana (Fundação Oswaldo Cruz/Universidade Federal da Bahia) – Presidente;
- Profa. DSc. Luana Leandro Gois. Doutora em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa (Fundação Oswaldo Cruz/Universidade Federal da Bahia)
- Profa. DSc. Juliana Perrone Bezerra. Doutora em Patologia Humana (Universidade Federal da Bahia/Fundação Oswaldo Cruz)

Membro Suplente:

- Prof. DSc. Lucas Pedreira de Carvalho. Doutor em Patologia Humana (Fundação Oswaldo Cruz/Universidade Federal da Bahia)

“Em minhas preces de todo dia, sempre peço coragem e paciência. Coragem para continuar superando as dificuldades do caminho naqueles que não me compreendem. E paciência, para não me entregar ao desânimo diante das minhas fraquezas.”
Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a **Deus e meus guias** por me auxiliarem e reestabelecerem minhas forças durante esse trabalho, certamente sem a fé os momentos difíceis seriam ainda mais difíceis, e eu não teria chegado aqui.

Agradeço ao meu orientador **Ricardo Khouri**, muito obrigada por sua compreensão diante dos desafios, muitos, que enfrentei durante o desenvolvimento desse trabalho, sua paciência e instrução foram essenciais para que chegássemos aqui, serei eternamente grata a você por tudo.

Quero agradecer também a **minha família**, especialmente **minha mãe**, sem a qual o caminho do conhecimento para mim seria ainda mais complicado, como professora e mãe a senhora me ajudou muito e nessa vida não há como retribuir tudo que fez por mim, obrigada.

Agradeço aos **meus colegas de trabalho, especialmente Laise de Moraes e Cibele Orge**, que me auxiliaram em tantos momentos e durante o desenvolvimento desse trabalho, a vocês minhas queridas, toda minha gratidão.

Ao PPGCS pela oportunidade e por todo apoio prestado durante o mestrado, à CAPES pela bolsa e provimento financeiro recebido.

E por fim, ao meu filho **Benjamim**, você chegou no meio do mestrado e modificou completamente minha vida, ser sua mãe é minha maior conquista, e tudo aquilo que vier depois de sua chegada, é para oferecer a você todas as possibilidades que não tive, te amo.

“O Senhor é o meu pastor, nada me faltará.

Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranquilas.

Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça, por amor do seu nome.

Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque tu estás comigo;

a tua vara e o teu cajado me consolam.

Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos,

unges a minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda.

Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida;

e habitarei na casa do Senhor por longos dias.”

Salmos 23:1-6

DEDICATÓRIA

Essa dissertação de mestrado é dedicada ao meu filho, Benjamim, seu sorriso me deu forças para seguir diante de todas as dificuldades do caminho, sua chegada veio para transformar a minha vida, amo você infinitamente.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABELAS.....	11
ÍNDICE DE SIGLAS OU ABREVIATURAS	12
RESUMO.....	13
II. OBJETIVOS	14
III. INTRODUÇÃO	15
IV. REVISÃO DA LITERATURA	17
IV.1. ARBOVÍRUS.....	17
IV.2. EPIDEMIOLOGIA DO CHIKV NO MUNDO E NO BRASIL	17
IV.3. VÍRUS CHIKUNGUNYA.....	19
IV.4. CICLO DE TRANSMISSÃO DO CHIKV.....	22
IV.5. FASES DA DOENÇA CAUSADO PELO CHIKV	23
IV.5.1. Fase aguda ou febril	24
IV.5.2. Fase subaguda	25
V.5.3. Fase crônica	26
IV.6. MANEJO CLÍNICO E TRATAMENTO DA ARTRALGIA CRÔNICA CAUSADA PELA INFECÇÃO POR CHIKV	26
IV.7. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR CHIKV	29
V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	32
V.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	32
V.2. ÉTICA.....	32
V.3. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	33
V.4. ISOLAMENTO DO RNA VIRAL	33
V.5. DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DO RNA VIRAL DE CHIKV, ZIKV E DENV	33
V.6. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA DETECÇÃO DE IgM CONTRA CHIKV, ZIKV E DENV	34

	9
V.7. CLASSIFICAÇÃO DE ARTRALGIA CRÔNICA	34
V.8. ESCORE SHERA	34
V.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
VI. RESULTADOS	36
VI.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA POPULAÇÃO	36
VI.2. COMPARAÇÃO ENTRE RT-PCR E SOROLOGIA PARA DETECÇÃO DE CHIKV AO LONGO DO TEMPO	39
VI.3. ASSOCIAÇÃO ENTRE INTENSIDADE CLÍNICA OU ARTRALGIA CRÔNICA VERSUS CARGA VIRAL (Ct) OU PRODUÇÃO DE IgM (índice)	40
VII. DISCUSSÃO.....	41
VIII. CONCLUSÕES	44
SUMMARY.....	45
REFERÊNCIAS.....	46
ANEXO 1	53
ANEXO 2	59
ANEXO 3	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I Países e territórios onde foram relatados casos de Chikungunya até 30 de outubro de 2020	18
Figura II Perfil morbi-mortalidade por Chikungunya no Brasil, para cada 100 mil habitantes, entre 2017 e 2021	19
Figura III Organização molecular do vírus da Chikungunya.	20
Figura IV Replicação do CHIKV	22
Figura V Infográfico mostrando os ciclos de transmissão do CHIKV	23
Figura VI Patogênese da infecção por CHIKV: disseminação viral e impacto na resposta imune do hospedeiro	24
Figura VII Principais sinais da apresentação clínica da infecção por CHIKV. A) Paciente com rash cutâneo na palma da mão; B) pacientes com acometimento articular em diversas regiões do corpo. (BRASIL, 2017).	25
Figura VIII Outros sinais da apresentação clínica da infecção por CHIKV. A) Paciente com lesões orais, sintoma atípico de CHIKV; B) paciente com rash cutâneo; C) pacientes com acometimento edema articular. (BRASIL, 2017)	26
Figura IX Classificação de risco dos pacientes com suspeita de infecção por CHIKV (Adaptado: Chikungunya: manejo clínico, 2017)	27
Figura X Conduta para pacientes com suspeita de infecção por CHIKV. (Adaptado: Chikungunya: manejo clínico, 2017).....	28
Figura XI Sintomas da fase aguda de infecção por DENV, ZIKV e CHIKV.	29
Figura XII Janela de Diagnóstico laboratorial para CHIKV	30
Figura XIII Algoritmo para o diagnóstico da infecção aguda pelo vírus Chikungunya (Adaptado de GAIBANI et al., 2016).....	31
Figura XIV Testagem de RT-qPCR e IgM para CHIKV. A) Diagrama de Venn que ilustra a sobreposição na detecção do CHIKV por RT-qPCR em diferentes amostras biológicas (plasma, saliva e urina testados). B) Diagrama de Venn que ilustra a sobreposição na detecção de infecção por CHIKV por RT-qPCR versus detecção de IgM anti-CHIKV por ELISA em amostras de plasma	37
Figura XV Comparação entre diagnóstico molecular e sorológico para CHIKV.	39
Figura XVI Ausência de associação entre intensidade clínica ou artralgia crônica versus carga viral ou produção de IgM.....	40

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Características sociodemográficas e laboratoriais dos pacientes com sintomas de infecção por arbovírus	36
Tabela 2. Características sociodemográficas e clínica dos pacientes diagnosticados com CHIKV	38

ÍNDICE DE SIGLAS OU ABREVIATURAS

CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
CHIKF	Febre Chikungunya
CHIKV	Vírus da Chikungunya
DENV	Vírus da Dengue
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECSA	Centro-Leste-Sul-Africano
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
IBMP	Instituto de Biologia Molecular do Paraná
IFA	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IOL	Ásia e Oceano Índico
MAC-ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática de captura
MS	Ministério da Saúde
ORFs	Frames de leitura aberta
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-qPCR	Transcrição reversa - Reação em Cadeia da Polimerase
SHERA	<i>Sex, Hypertension, Edema, Retroocular pain and Age</i>
WA	África Ocidental
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZIKV	Vírus da Zika

RESUMO

Introdução: Desde 2014, três arboviroses, Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV), co-circulam no Brasil causando grandes surtos sazonais. A apresentação clínica das infecções por ZIKV, DENV e CHIKV na fase aguda são similares, incluindo febre, mialgia, erupção maculopapular, prurido, artralgia e artrite. No entanto, o curso clínico e o risco de complicações são bastante distintos, por isso o diagnóstico diferencial é essencial para o melhor tratamento e controle das doenças. **Objetivos:** Criar um biorrepositório e aperfeiçoar o diagnóstico dos casos de infecção aguda por CHIKV no estado da Bahia. **Material e Métodos:** Estudo de coorte realizado com 230 indivíduos de duas cidades no estado da Bahia e uma do Ceará com quadro clínico suspeito de infecção por arbovírus em 2016 e 2017. Dados clínicos e epidemiológicos foram coletados através de questionário e avaliação clínica em postos de saúde locais, foi aplicado o escore de predição SHERA durante a avaliação clínica. Foram coletadas amostras de saliva, sangue e urina, todas as amostras foram testadas em RT-qPCR para confirmação de infecção, e o plasma foi testado com ELISA IgM. Todos os pacientes mono-infectados com tempo de doença <10 dias foram mantidos no estudo e reavaliados após 12 meses. **Resultados:** Observamos dentro da coorte que 50% dos pacientes evoluíram para artralgia crônica na avaliação após 12 meses da infecção, os sintomas mais presentes foram artralgia, mialgia e dor de cabeça, aproximadamente 34% dos indivíduos apresentaram lesões orais decorrentes da infecção. Na avaliação molecular 35,87% foram positivos para CHIKV, 0,45% para DENV, 3,14% para ZIKV, na análise sorológica 54,42% foram positivos para CHIKV, 7,55% para ZIKV e 4,19% para DENV. A amostra com melhor desempenho para detecção molecular foi o plasma. Não houve diferença significativa entre os kits de PCR utilizados. O melhor momento de detecção molecular observado foi até o 5 dia de doença, e para sorologia a partir do 4 dia. Não houve correlação significativa entre a carga viral e índice IgM e a evolução para artralgia crônica. **Conclusões:** Este trabalho demonstrou o melhor momento de testagem, qual método tem melhor desempenho e a amostra ideal a ser utilizada para detecção de CHIKV em pacientes com suspeita de infecção por arbovírus. A evolução para quadros crônicos foi observada em metade dos indivíduos testados, demonstrando a necessidade do diagnóstico diferencial e monitoramento pelo sistema de saúde.

Palavras-chave: 1. Chikungunya vírus; 2. Diagnóstico; 3. Arbovírus; 4. RT-qPCR em tempo real; 5. Artralgia; 6. Zika; 7. Dengue.

II. OBJETIVOS

PRINCIPAL

Otimizar as estratégias de diagnóstico dos casos de infecção aguda por CHIKV no estado da Bahia.

SECUNDÁRIOS

1. Coletar e armazenar amostras biológicas de pacientes com quadro agudo sugestivo de arboviroses, seguido de confirmação diagnóstica por RT-qPCR e sorologia para IgM;
2. Determinar através de RT-qPCR a prevalência do CHIKV entre as amostras biológica coletadas (plasma, urina e saliva);
3. Avaliar se os níveis de carga viral (Cts) e IgM (índice) são associados a artralgia crônica causada pela infecção por CHIKV.

III. INTRODUÇÃO

Os vírus Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV), desde 2014 co-circulam no Brasil causando grandes surtos sazonais. Essas arboviroses são transmitidas principalmente por fêmeas do mosquito vetor *Aedes spp.*, altamente disseminado pelo país (CAMPOS, BANDEIRA, SARDI, 2015; FARIA *et al.*, 2016; SALVADOR, FUJITA, 2016).

O DENV é membro da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivírus*, possui quatro sorotipos distintos (DENV-1 a DENV-4). A primeira confirmação de epidemia de DENV ocorreu em Boa Vista, no estado de Roraima, em 1981. Outro vírus do mesmo gênero o ZIKV, possui dois genótipos diferentes, o Asiático e Africano, ele foi detectado pela primeira vez no Brasil em março de 2015 (ZANLUCA *et al.*, 2015). Porém, datações moleculares indicam que o vírus entrou no país em 2013 (NUNES *et al.*, 2015).

O CHIKV pertence ao gênero *Alphavírus* da família *Togaviridae*, possui quatro genótipos diferentes: Asiático, Leste-Centro-Sul Africano (ECSA), Oeste Africano, Linhagem Oceano Índico (IOL) (PETERSEN, *et al.*, 2016; NUNES *et al.*, 2015). Em setembro de 2014, foram confirmados os primeiros relatos autóctones quase que simultaneamente no Oiapoque, AP (genótipo Asiático) e em Feira de Santana, BA (genótipo ECSA) (FARIA *et al.*, 2016).

A apresentação clínica das infecções por ZIKV, DENV e CHIKV na fase aguda são similares, os sintomas incluem febre, mialgia, erupção maculopapular, prurido, artralgia e artrite. No entanto, o curso clínico e o risco de complicações são bastante distintos (MOTA *et al.*, 2016; MUSSO *et al.*, 2014; PATTERSON, SAMMON, GARG, 2016; PETERSEN *et al.*, 2016).

A infecção pelo ZIKV está associada a um maior risco de desenvolvimento de lesões neurológicas em bebês (COSTA *et al.*, 2016; SARNO *et al.*, 2016) e adultos (VINHAES *et al.*, 2016), como a Síndrome Congênita do Zika (DE PAULA FREITAS *et al.*, 2017; PAPLOSKI *et al.*, 2016) e a Síndrome de Guillain-Barré (ARAUJO, FERREIRA, NASCIMENTO, 2016; CAO-LORMEAU *et al.*, 2016; PAPLOSKI *et al.*, 2016). O DENV pode causar quadros hemorrágicos potencialmente letais, principalmente em indivíduos em uso de anti-inflamatórios (POTTS, ROTHMAN, 2008). O CHIKV é comumente caracterizado por artralgia grave e persistente na fase crônica da doença que pode durar anos (SCHWARTZ *et al.*, 2010).

Assim, é necessário um manejo clínico adequado e específico para tratar as diferentes complicações associadas a essas três arboviroses, reduzindo os impactos socioeconômicos destas doenças no país.

Considerando a impossibilidade de distinção destas infecções durante a fase aguda apenas com base no quadro clínico, é fundamental que o sistema de saúde possa se apoiar em um diagnóstico laboratorial preciso, capaz de identificar precocemente a infecção por estes arbovírus. Assim, avaliamos através de uma coorte, a detecção de infecção por CHIKV através de técnicas moleculares e sorológicas, para estimar a janela de viremia, e produção de anticorpos IgM, em diferentes amostras biológicas de indivíduos infectados com CHIKV nos primeiros 10 dias de sintomas. Ademais, avaliamos se esses títulos virais e de anticorpos na fase aguda podem prever artralgia crônica provocada pelo CHIKV.

IV. REVISÃO DA LITERATURA

IV.1. ARBOVÍRUS

Arbovírus é uma contração do termo derivado da expressão inglesa *Mosquito-borne viruses*, utilizado para classificar vírus que tem como característica comum a necessidade de dois organismos para se manter na natureza: um artrópode hematófago que pode ser mosquito ou carrapato e um animal vertebrado de diferentes gêneros e espécies (MUSSO, GUBLER, 2016).

Os arbovírus constituem o maior grupo conhecido de vírus, sendo registrados 537 tipos diferentes, distribuídos por quase todos os continentes (HIGGS, 2001). Estão distribuídos em sete famílias, as quais seis delas possuem agentes que tem como material genético o RNA (*Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Orthomyxoviridae*) e apenas uma família composta por vírus de DNA (*Asfarviridae*) (HOLLIDGE *et al.*, 2010). A estrutura genômica dos arbovírus do tipo RNA pode ser de cadeia simples ou dupla, segmentada ou não (SCHNETTLER, 2013).

Diante das constantes mudanças ambientais antropogênicas e climáticas, somadas às adaptações genéticas de vírus a hospedeiros, vetores e novos ambientes, a circulação de arbovírus tem sido uma ameaça à saúde humana há séculos (WEAVER, 2010; DONALISIO, FREITAS & VON ZUBEN, 2017).

IV.2. EPIDEMIOLOGIA DO CHIKV NO MUNDO E NO BRASIL

O nome Chikungunya deriva de uma palavra em Makonde que significa “aqueles que se dobram”, descrevendo a aparência encurvada de pessoas que sofrem com a artralgia característica da doença (MORRISON, 2014). O primeiro surto foi relatado em 1952 no planalto Makonde, ao longo da fronteira entre a Tanzânia e Moçambique, na África (SOLIGNAT *et al.*, 2009). Entre as décadas de 1960 e 1990, o CHIKV foi responsável por surtos na África Oriental, Ocidental e Central (WEINBREN, 1958).

Após um grande surto que aconteceu na costa do Quênia em 2004, o vírus começou a se espalhar para as ilhas do Oceano Índico, Índia e sudeste da Ásia, com mais de 6 milhões de

casos suspeitos reportados (POWERS *et al.*, 2000; SERGON *et al.*, 2007, 2008; STAPLES *et al.*, 2009; THIBERVILLE *et al.*, 2013). Em 2005, um surto de CHIKV foi relatado nas Comores, que causou a infecção em aproximadamente 215.000 pessoas (SERGON *et al.*, 2007). Entre março de 2005 e abril de 2006, cerca de 255.000 pessoas foram infectadas nas Ilha da Reunião (GÉRARDIN *et al.*, 2008; JOSSERAN *et al.*, 2006).

Em outubro de 2013, foi relatado pela primeira vez nas Américas, na ilha de Saint Martin no Caribe (LEPARC-GOFFART *et al.*, 2014). O primeiro caso autóctone de transmissão de CHIKV no Brasil foi relatado em setembro de 2014 no Amapá, cujo genótipo identificado foi o Asiático, no mesmo ano na Bahia ocorreu outro surto, dessa vez causado pela linhagem ECSA (NNUES *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2016). De setembro de 2014 e até o final de dezembro de 2015, quase 1 milhão de casos foram notificados nas Américas, resultando em 71 mortes, com transmissão autóctone relatada em mais de 50 territórios (FARIA *et al.*, 2016) (Figura I).

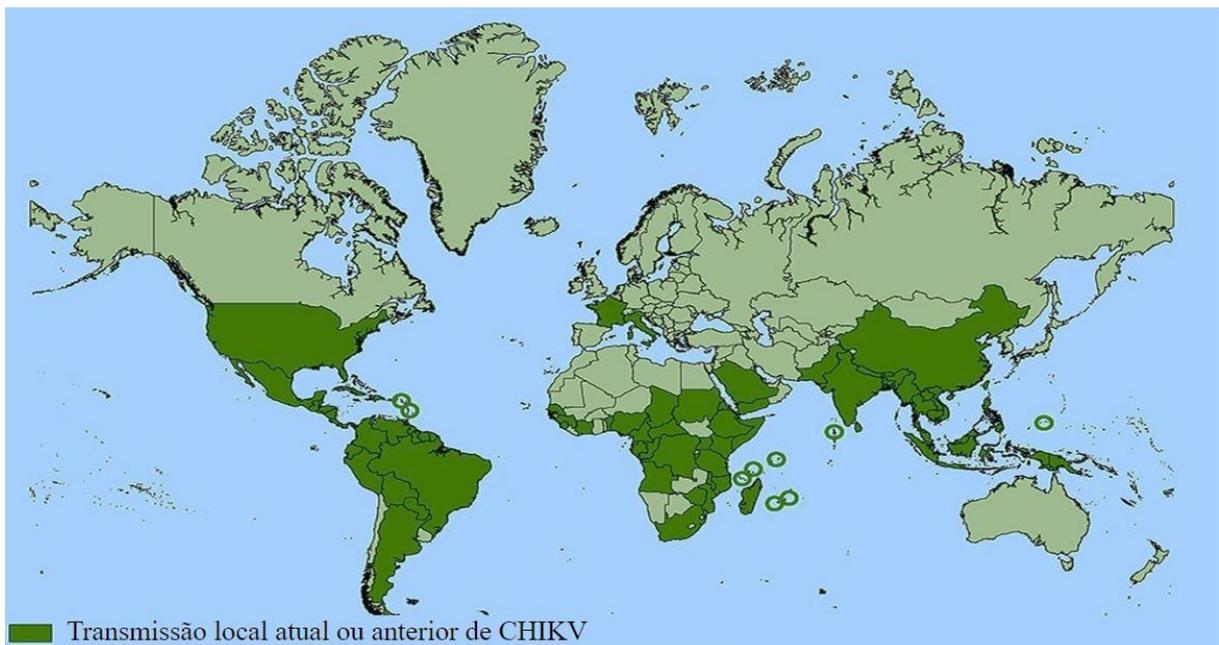


Figura I Países e territórios onde foram relatados casos de Chikungunya até 30 de outubro de 2020. (Adaptado de CDC, 2020).

Em 2015, o Ministério da Saúde do Brasil notificou um total de 20.661 casos suspeitos de CHIKV, sendo que, 38% destes tiveram confirmação clínica e 35% tiveram confirmação laboratorial. É provável que esses números representem apenas uma fração dos indivíduos infectados, isto devido aos casos de CHIKV serem baseados no diagnóstico clínico, sendo confundidos com infecções por outras arboviroses como DENV ou ZIKV (FARIA *et al.*, 2016).

Cunha e colaboradores (2017), descreveram através de um estudo soro epidemiológico, realizado na Bahia após a primeira onda epidêmica, onde foi possível observar que durante o surto avaliado, para cada caso notificado de CHIKV, outros 1,94 casos não eram notificados ao sistema de vigilância em saúde. Em 2017 foram registrados 185.593 casos prováveis de CHIKV no Brasil.

De acordo com o Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde, houve no Brasil aproximadamente 176 mil casos suspeitos de CHIKV, o qual se refere as notificações ocorridas em 2020 e 2021, a região Nordeste apresentou as maiores taxas de incidência e com maior número de casos registrados (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2021). A infecção por CHIKV é, portanto, um sério problema de saúde pública que pode afetar significativamente a economia e o sistema de saúde do país (CUNHA *et al.*, 2017).

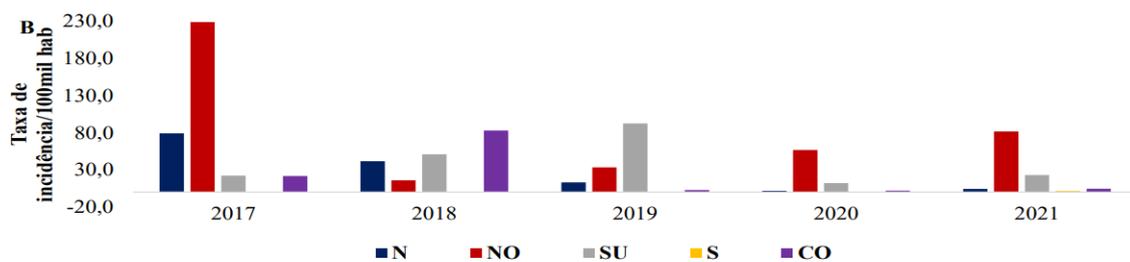


Figura II Perfil morbi-mortalidade por Chikungunya no Brasil, para cada 100 mil habitantes, entre 2017 e 2021. Onde, B: taxa de incidência nas grandes regiões. (Adaptado de COUCEIRO *et al.*, 2022).

IV.3. VÍRUS CHIKUNGUNYA

O CHIKV é um vírus membro da família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus* que possui RNA de cadeia positiva de aproximadamente 12kb. O genoma do CHIKV é responsável por codificar quatro proteínas não-estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4), e cinco proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K e E1), expressas a partir de RNA subgenômico sintetizado nas células hospedeiras (RUPP, 2015). Além disto, o CHIKV possui um curto fragmento na região 5' não traduzido e uma região não traduzida mais longa com estruturas tronco-loop e repetições diretas que se acredita estar associada à adaptação do vírus ao mosquito (BURT *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2013).

O genoma viral possui dois frames de leitura aberta (ORFs) (ARIAS-GOETA *et al.*, 2014; DE FIGUEIREDO *et al.*, 2014). A ORF que ocupa a extremidade 5' do genoma, é diretamente traduzida do RNA subgenômico para uma poli proteína que dará origem as quatro proteínas não estruturais (RUPP *et al.*, 2015; DE FIGUEIREDO, 2014; STRAUSS, 1994), enquanto a outra ORF na extremidade 3', é diretamente traduzida do RNA subgenômico 26S e codifica uma segunda poliproteína que após clivagem, é responsável por gerar as proteínas estruturais (KHAN *et al.*, 2002; CARRASCO *et al.*, 2018) (Figura IIIA).

O vírus apresenta um envelope lipídico, com a mesma composição da bicamada lipídica da membrana da célula hospedeira, na qual estão ancoradas as glicoproteínas virais E1 e E2 (STRAUSS, 1994), e um núcleo capsídeo de simetria icosaédrica constituído pela proteína do capsídeo (Proteína C), que envolve e protege o genoma viral (KHAN *et al.*, 2002; RUPP *et al.*, 2015; STRAUSS, 1994) (Figura IIIB).

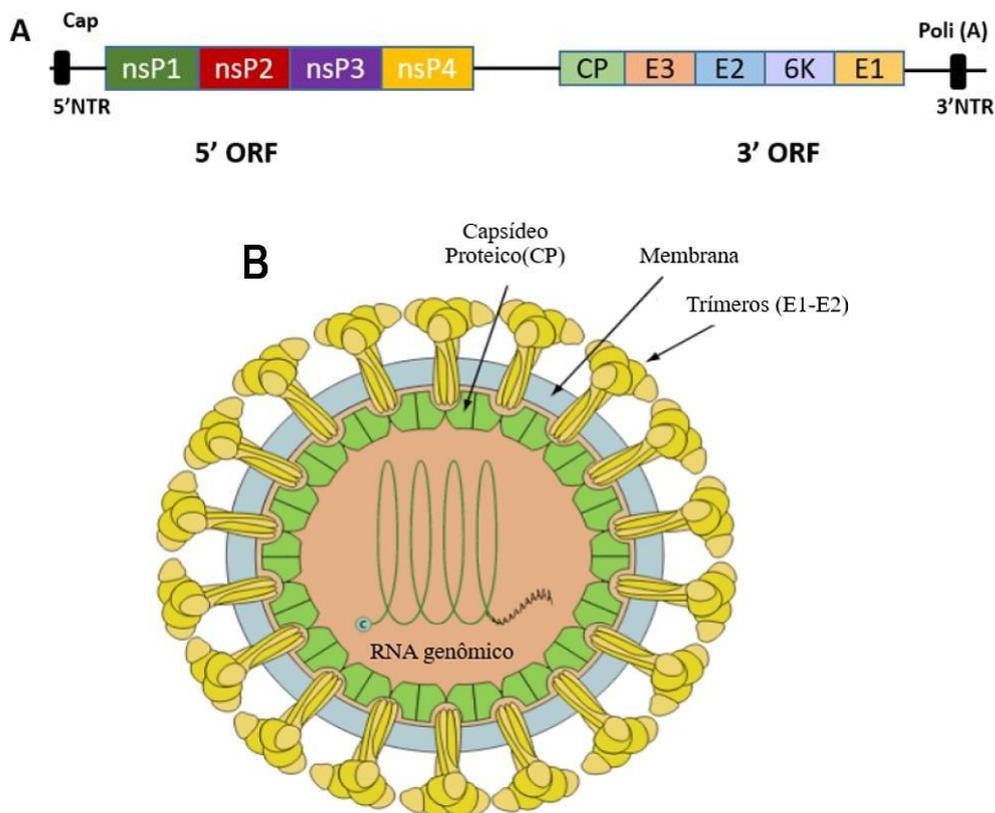


Figura III Organização molecular do vírus da Chikungunya. A) Estrutura do genoma do CHIKV; B) Estrutura da partícula do vírus CHIKV. (Adaptado de AN *et al.*, 2017).

As proteínas não estruturais são enzimas ou fatores de transcrição que são codificadas e traduzidas somente durante a replicação viral (SREEJITH *et al.*, 2012). A nsP1 está envolvida no encapsulamento do RNA, funcionando como uma âncora da membrana do complexo de replicação (FROS; PIJLMAN, 2016; SCHWARTZ *et al.*, 2010), ela é importante para instrução da direção de leitura e para o nivelamento do RNA viral (RUPP *et al.*, 2015). A nsP2 está envolvida com o processamento auto catalítico das poli proteínas não estruturais P1234 apresentando três funções: helicase, trifosfatase e protease (VOSS *et al.*, 2010; SOLIGNAT *et al.*, 2009; LANCIOTTI *et al.*, 2007).

A função da proteína nsP3 na replicação viral ainda não é bem elucidada, e compreende-se que é uma proteína altamente fosforilada, essencial no complexo de replicação viral (TSETSARKIN *et al.*, 2011; RUPP *et al.*, 2015). A nsP4, por sua vez, é uma RNA polimerase RNA-dependente, parte integrante do complexo de replicação dos Alphavírus (KUMAR *et al.*, 2014). A proteína do capsídeo (C) envolve o RNA sintetizado, reconhecendo sinais de encapsulamento específicos. As glicoproteínas E1 e E2 interagem entre si para formar heterodímeros (MCPHERSON *et al.*, 2017).

Funcionalmente a glicoproteína E2 estabelece uma ligação entre a partícula viral e os receptores da célula hospedeira. Enquanto 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. O peptídeo 6k é responsável por atuar como uma sequência sinal para a translocação de E1, essencial para a montagem das partículas virais (SOLIGNAT *et al.*, 2009) (Figura IV).

Análises filogenéticas permitiram a classificação do CHIKV em 4 linhagens que foram nomeadas de acordo com sua localização geográfica do isolamento das primeiras amostras, que são: A linhagem Leste-Central-África do Sul (ECSA), a linhagem Asiática, a linhagem África Ocidental (WA) (POWERS *et al.*, 2000; VOLK *et al.*, 2010) e a linhagem do Oceano Índico (IOL) (NUNES *et al.*, 2015; TSETSARKIN *et al.*, 2007).

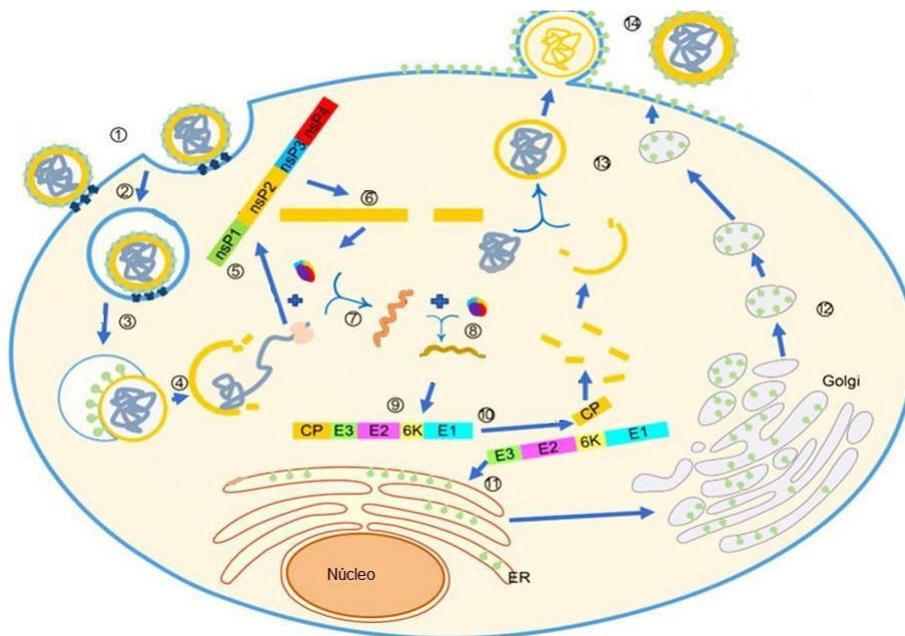


Figura IV Replicação do CHIKV. ① A glicoproteína E2 viral liga-se aos receptores na superfície celular. ② Entrada nas células por endocitose mediada por clatrina ou independente de clatrina. ③. Em ambiente ácido no endossomo, o heterodímero E2-E3 se dissocia e a conformação de E1 muda, permitindo que a membrana da célula hospedeira e o envelope do vírus se fundam. ④ O nucleocapsídeo é liberado no citoplasma e depois desmontado, permitindo a liberação do RNA genômico. ⑤ Proteínas não estruturais são traduzidas. ⑥ A poliproteína cliva autoproteoliticamente em nsP123 e nsP4. ⑦ nsP4 forma a RNA replicase com nsP123 e algumas proteínas da célula hospedeira. A seguir, o RNA de fita negativa é sintetizado. ⑧ O RNA negativo é usado como molde para a síntese do RNA positivo e do RNA subgenômico. ⑨. As proteínas estruturais são geradas. ⑩. Clivado autoproteoliticamente para separar a proteína do capsídeo da poliproteína pE2-6k-E1. ⑪. As poliproteínas pE2-6K-E1 são inseridas no retículo endoplasmático para continuar o processo. ⑫. Após transportada de ER para Golgi e da última para PM, a poliproteína sofre o processamento pós-tradição, permitindo a formação do heterodímero E2-E1 maduro. ⑬. As proteínas do capsídeo interagem com o RNA genômico e formam os nucleocapsídeos. ⑭ Nucleocapsídeos são transportados para PM e enxertados com a membrana do hospedeiro para formar o vírus maduro (Adaptado de AN *et al.*, 2017).

IV.4. CICLO DE TRANSMISSÃO DO CHIKV

A transmissão se dá através da picada de fêmeas dos mosquitos *Aedes (Ae.) aegypti* e *Ae. albopictus* infectadas pelo CHIKV (BRASIL., 2017). O vírus geralmente circula em um ciclo silvestre entre primatas não humanos ou hospedeiros mamíferos reservatórios e mosquitos do gênero *Aedes*. Durante epidemias urbanas, o CHIKV pode ser transmitido para hospedeiros humanos através de picadas de mosquitos *Aedes spp.* infectados.

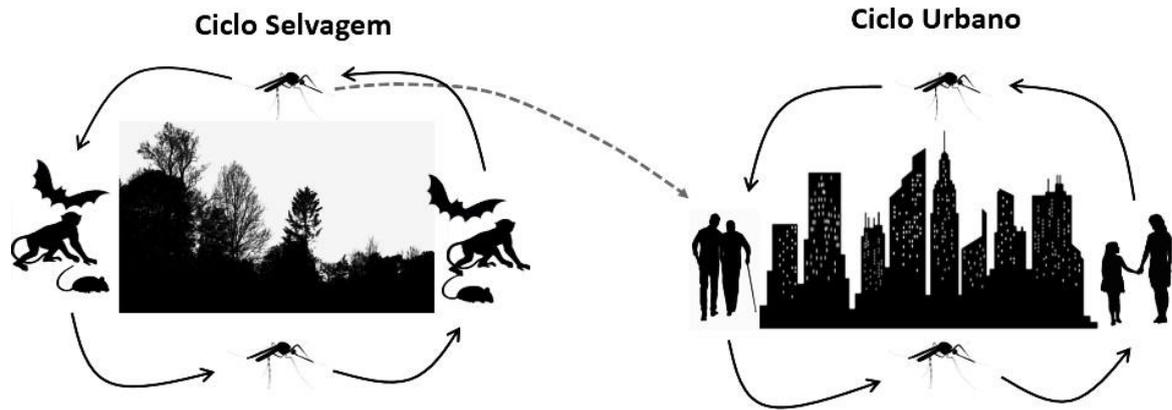


Figura V Infográfico mostrando os ciclos de transmissão do CHIKV. O vírus é mantido em dois ciclos: ciclo silvestre que ocorre principalmente na África e o vírus é mantido entre primatas não humanos, morcegos, roedores e outros vertebrados. No ciclo urbano que ocorre principalmente na Ásia, onde o vírus transmitido circula diretamente no hospedeiro humano através do ciclo de transmissão humano-mosquito-humano (KUMAR *et al*, 2020).

IV.5. FASES DA DOENÇA CAUSADO PELO CHIKV

Após a picada do mosquito, o vírus entra na pele e na corrente sanguínea. Após a replicação inicial nos fibroblastos dérmicos, o CHIKV se espalha pela corrente sanguínea, podendo atingir o fígado, músculos, articulações, baço, nódulos linfáticos e cérebro (WHO, 2021).

O início da doença geralmente ocorre após um período de incubação de 4 a 8 dias após picada e é caracterizada por um início abrupto com febre alta ($>39^{\circ}\text{C}$), frequentemente acompanhada de dor nas articulações e mialgia, além de erupção cutânea maculopapular eritematosa, que pode variar de leve e localizada a uma erupção cutânea extensa envolvendo mais de 90% da pele (BURT *et al.*, 2017). A dor nas articulações costuma ser muito debilitante e geralmente dura alguns dias, mas pode se prolongar por semanas, meses ou até anos. Outros sinais e sintomas comuns incluem, inchaço nas articulações, dor de cabeça, náuseas e fadiga (BRASIL, 2021).

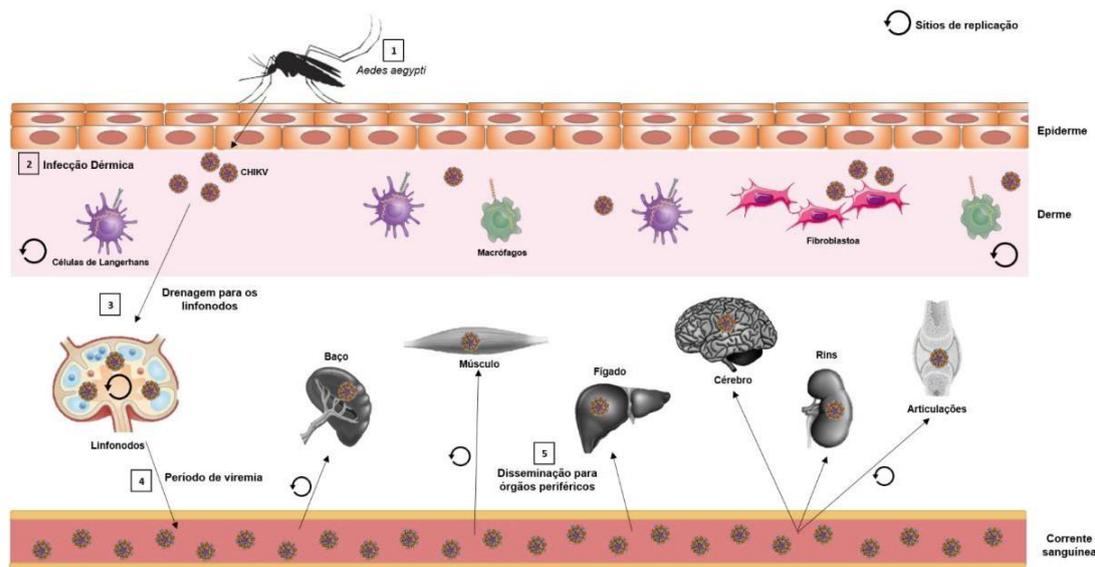


Figura VI Patogênese da infecção por CHIKV: disseminação viral e impacto na resposta imune do hospedeiro. (1) A infecção por CHIKV ocorre através da picada de um mosquito infectado, resultando em uma (2) fase de infecção dérmica. Os fibroblastos da pele são infectados, permitindo o início da replicação viral. (3) Inoculação direta do vírus na circulação também pode ocorrer através da picada do mosquito. (4) O vírus se dissemina para os gânglios linfáticos, onde se replica ainda mais antes de ser (5) liberado na circulação. (6) Em seguida, dissemina-se para órgãos periféricos, como o baço, fígado e os músculos, onde continua a se replicar, chegando ao cérebro pela corrente sanguínea (Adaptado de LUM *et al.*, 2015).

A infecção pode evoluir em três fases: febril ou aguda, pós-aguda e crônica. A fase aguda tem duração de 5 a 14 dias. A fase pós-aguda tem um curso de até 3 meses. Se os sintomas persistirem por mais de 3 meses após o início da doença, considera-se instalada a fase crônica (SILVA, 2017). Em mais de 50% dos casos, a artralgia torna-se crônica, podendo persistir por anos, existem casos raros associados à desfecho de morte, contudo, infecções graves podem se manifestar com encefalite e encefalopatia, miocardite, hepatite e falha múltipla de órgãos (CUNHA R *et al.*, 2017). E cerca de 85% dos indivíduos não previamente expostos ao CHIKV estão sob o risco de adquiri-lo e desenvolver a doença, considerando que cerca de 15% dos indivíduos infectados são assintomáticos (BURT *et al.*, 2017).

IV.5.1. Fase aguda ou febril

A fase aguda ou febril da doença é caracterizada principalmente por febre de início súbito e surgimento de intensa poliartralgia, geralmente acompanhada de dores nas costas, cefaleia e fadiga, com duração média de sete dias. A poliartralgia tem sido descrita em mais de 90% dos pacientes com CHIKV na fase aguda. A dor articular normalmente é poliarticular,

simétrica, mas pode haver assimetria. Acomete grandes e pequenas articulações e abrange com maior frequência as regiões mais distais (Figura VII). Pode haver edema, e este, quando presente, normalmente está associado a tenossinovite. Outros sinais e sintomas descritos na fase aguda da infecção causada por CHIKV são dor retro orbital, calafrios, conjuntivite faringite, náusea, vômitos, diarreia, dor abdominal, neurite e linfadenomegalia cervical associada. As manifestações do trato gastrointestinal são mais presentes nas crianças (BRASIL, 2017).

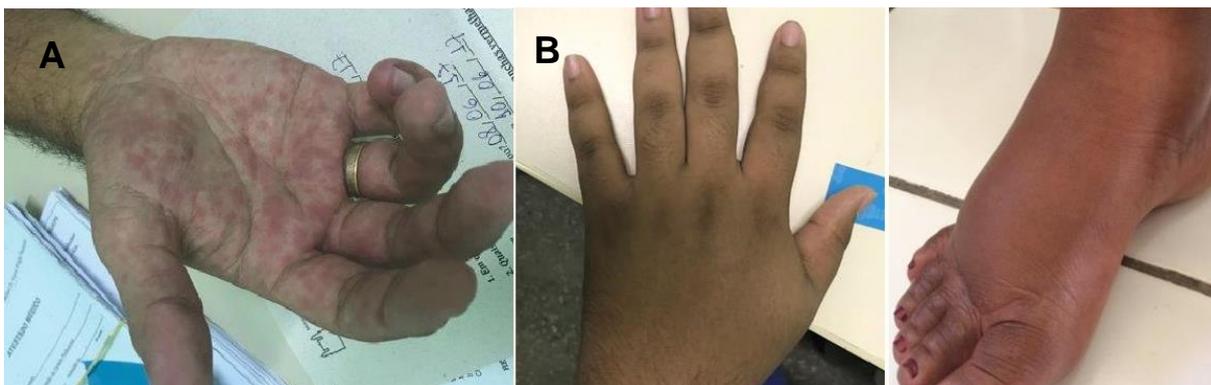


Figura VII Principais sinais da apresentação clínica da infecção por CHIKV. A) Paciente com rash cutâneo na palma da mão; B) pacientes com acometimento articular em diversas regiões do corpo. (BRASIL, 2017).

IV.5.2. Fase subaguda

Durante esta fase a febre normalmente desaparece, podendo haver persistência ou agravamento da artralgia, incluindo poliartrite distal, exacerbação da dor articular nas regiões previamente acometidas na primeira fase e tenossinovite hipertrófica subaguda em punhos e tornozelos. O comprometimento articular costuma ser acompanhado por edema de intensidade variável. Há relatos de recorrência da febre. Podem estar presentes também nesta fase astenia, prurido generalizado e exantema maculopapular, além do surgimento de lesões purpúricas, vesiculares e bolhosas (BRASIL, 2017).



Figura VIII Outros sinais da apresentação clínica da infecção por CHIKV. A) Paciente com lesões orais, sintoma atípico de CHIKV; B) paciente com rash cutâneo; C) pacientes com acometimento edema articular. (BRASIL, 2017).

V.5.3. Fase crônica

Após a fase subaguda, alguns pacientes poderão ter persistência dos sintomas, principalmente dor articular e musculoesquelética. As manifestações têm comportamento flutuante. A prevalência desta fase é muito variável entre os estudos, podendo atingir mais da metade dos pacientes. O sintoma mais comum nesta fase crônica é o acometimento articular persistente ou recidivante nas mesmas articulações atingidas durante a fase aguda, caracterizado por dor com ou sem edema, limitação de movimento, deformidade e ausência de eritema. De acordo com um trabalho publicado por nosso grupo de pesquisa (anexo), foi possível determinar principais fatores presentes na fase aguda que estão associados à artralgia crônica: sexo feminino, hipertensão, edema, dor retro orbital e idade acima dos 26 anos. Com isso, nosso grupo descreveu um escore chamado SHERA, o qual pode ser aplicado para avaliar a progressão para fase crônica (DE MORAES *et al.*, 2020).

IV.6. MANEJO CLÍNICO E TRATAMENTO DA ARTRALGIA CRÔNICA CAUSADA PELA INFEÇÃO POR CHIKV

O manejo do paciente com suspeita de CHIKV é diferenciado de acordo com a fase da doença: aguda, subaguda ou crônica. Atualmente não há vacinas disponíveis para CHIKV, esforços estão sendo realizados para o desenvolvimento de uma vacina, como as vacinas virais inativadas (ECKLES; HARRISON; HETRICK, 1970) ou de vírus atenuados (WANG *et al.*, 2008) entretanto, mais estudos ainda são necessários para a obtenção de uma vacina. Logo o único tratamento disponível para CHIKV é o suporte sintomático, hidratação e repouso, e em

casos mais graves o acompanhamento médico especializado (BRASIL, 2017). Sistemas de acolhimento com classificação de risco devem ser implantados nos diferentes níveis de atenção para facilitar o fluxo adequado dos pacientes durante um surto. A triagem deve estar atenta para a identificação da presença dos sinais de gravidade, dos critérios de internação e grupos de risco (BRASIL, 2017).

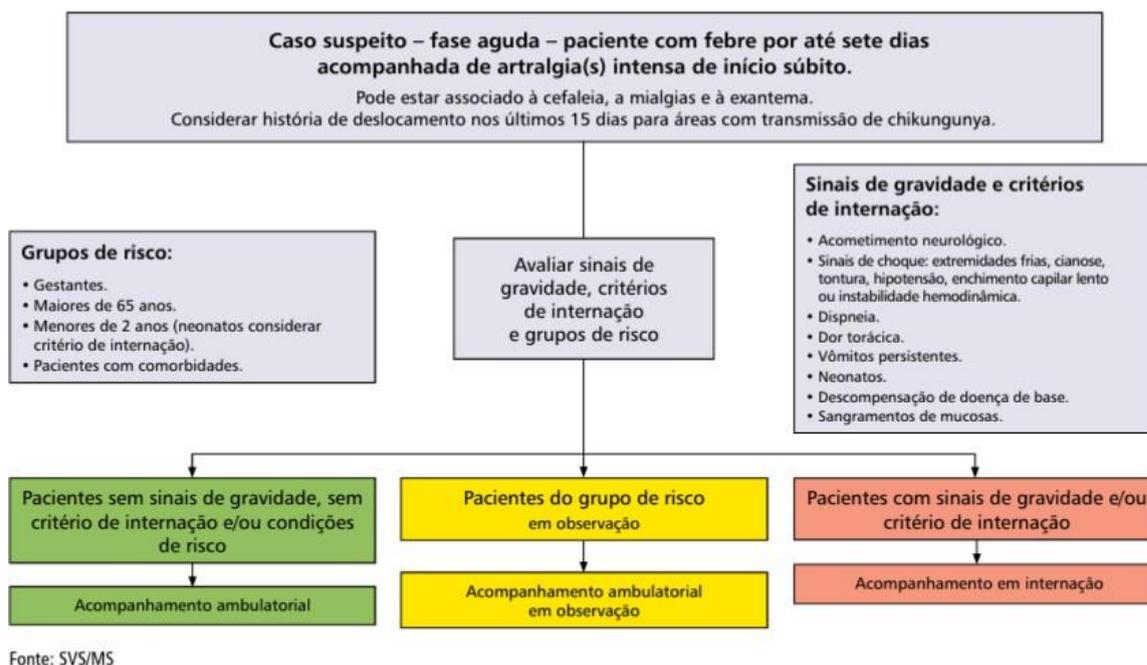


Figura IX Classificação de risco dos pacientes com suspeita de infecção por CHIKV (Adaptado: Chikungunya: manejo clínico, 2017).

Em áreas com circulação de Chikungunya, podem ocorrer casos com manifestações atípicas que não apresentam febre e dor articular; nestes casos o paciente será classificado como forma atípica da doença caso apresente alguma das seguintes manifestações:

- Meningoencefalite, encefalopatia, convulsão, síndrome de Guillain-Barré, síndrome cerebelar, paresias, paralisias e neuropatias;
- Neurite óptica, iridociclite, episclerite, retinite e uveíte;
- Miocardite, pericardite, insuficiência cardíaca, arritmia, instabilidade hemodinâmica;
- Hiperpigmentação por fotossensibilidade, dermatoses vesiculobolhosas, ulcerações aftosa-like. Nefrite e insuficiência renal aguda;
- Discrasia sanguínea, pneumonia, insuficiência respiratória, hepatite, pancreatite, síndrome da secreção inapropriada do hormônio antidiurético, insuficiência adrenal.

Gestantes podem transmitir o vírus a recém-nascidos por via transplacentária; a taxa de transmissão, pode chegar a 50%; e destes, cerca de 90% podem evoluir para formas graves, porém não está relacionada a efeitos teratogênicos, mas há raros relatos de abortamento espontâneo, não há transmissão pelo aleitamento materno. Também deve estar atento ao diagnóstico diferencial de dengue e de malária e na presença de sinais de gravidade dessas doenças. Se presentes, seguir os protocolos específicos para dengue e malária, e se necessário encaminhar às unidades de referência após a triagem e identificação da fase da doença. O indivíduo com suspeita de infecção por CHIKV deverá ser submetido à exames laboratoriais e avaliação clínica. Na fase aguda da febre Chikungunya, a maioria dos casos pode ser acompanhada ambulatoriamente. As unidades de Atenção Básica possuem papel primordial para avaliação e monitoramento desses casos (BRASIL, 2017).

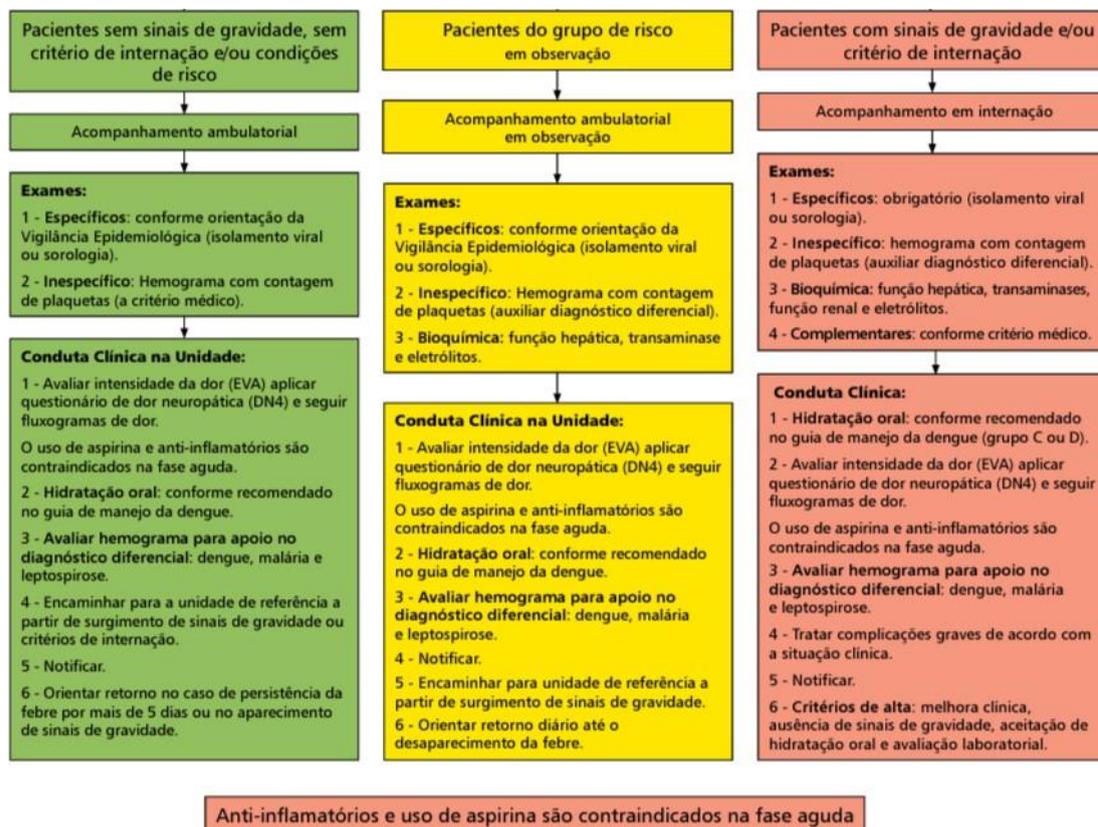


Figura X Conduta para pacientes com suspeita de infecção por CHIKV. (Adaptado: Chikungunya: manejo clínico, 2017).

IV.7. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR CHIKV

Nas áreas endêmicas, o diagnóstico de CHIKV geralmente é feito, majoritariamente, com base na história clínica e no exame físico do paciente. Contudo, o diagnóstico laboratorial é necessário para diferenciar outras doenças febris agudas associadas à artralgia. O clínico deve estar atento para outras causas potencialmente fatais e que exijam uma conduta medicamentosa específica imediata, como febre hemorrágica por DENV. Assim, todo caso suspeito de CHIKV deve ser notificado imediatamente ao serviço de vigilância epidemiológica, conforme fluxo estabelecido em cada município e as amostras encaminhadas para o diagnóstico laboratorial.

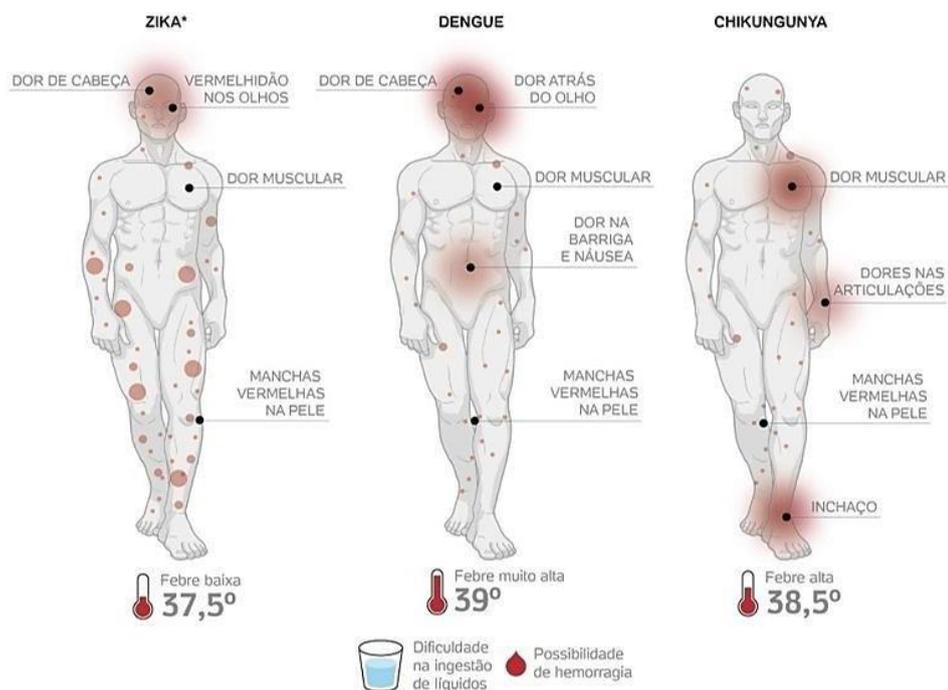


Figura XI Sintomas da fase aguda de infecção por DENV, ZIKV e CHIKV.

Segundo o Ministério da Saúde (2017) o diagnóstico laboratorial específico da infecção pelo CHIKV pode ser feito de duas formas: a forma direta ou indireta, o diagnóstico direto consiste na detecção da partícula viral e pode ser realizado por meio de técnicas moleculares (PCR) e isolamento viral, e a detecção indireta acontece através de testes sorológicos como o ELISA para detecção de anticorpos (IgG, IgM), entretanto é necessário considerar o tempo de evolução da doença para realização de cada método, pois realizar a detecção por um método no momento errado pode gerar resultados falsos-positivos ou falsos-negativos. Amostras coletadas do primeiro ao sétimo dia de início de sintomas podem ser encaminhadas para as provas

moleculares e sorológicas. A partir do oitavo dia de início de sintomas, devem-se encaminhar as amostras somente para testes sorológicos (Figura XII).

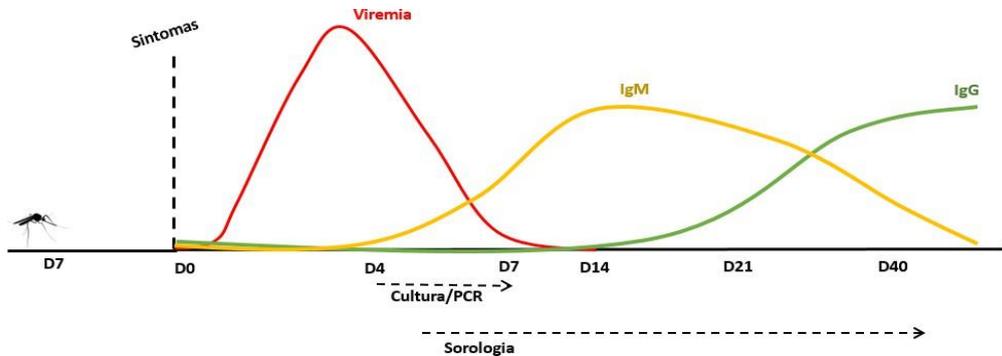


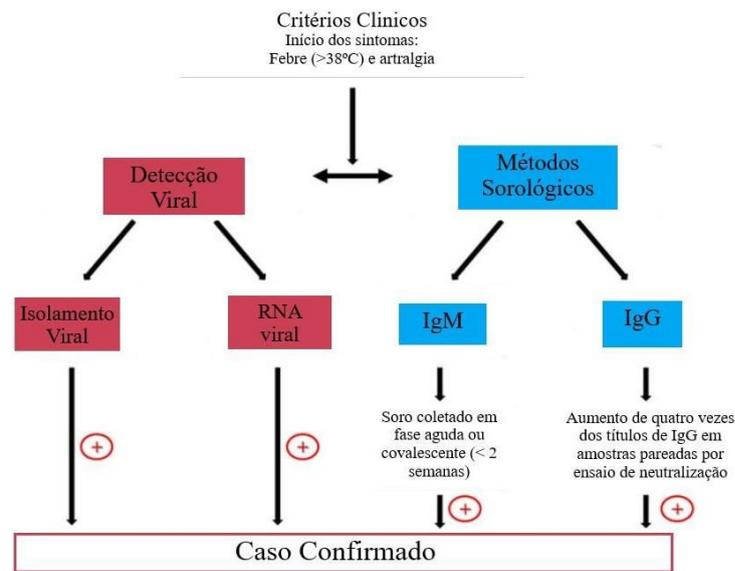
Figura XII Janela de Diagnóstico laboratorial para CHIKV.

O RNA do vírus é encontrado nas amostras entre 2 e 4 dias desde o início da febre, essa fase corresponde ao período de incubação, seguida por um início abrupto de febre acompanhada de vários sintomas, no estágio inicial da infecção o vírus se replica de forma acelerada, aumentando sua circulação no organismo, essa fase é chamada viremia, e normalmente dura de 4 a 6 dias após o início dos sintomas. Durante a fase viremica, os vírus podem ser isolados de soros ou plasma com diferentes culturas celulares (células Vero ou C6/36). O isolamento do vírus raramente é usado em diagnóstico de infecção por CHIKV, embora seja aplicado principalmente para estudos epidemiológicos. O diagnóstico da infecção pelo CHIKV na fase aguda da infecção é tipicamente realizado pela detecção de RNA viral por PCR/ RT-qPCR (KAUCHARZ ,2014; GAIBANI *et al.*, 2016).

Os testes sorológicos são os métodos mais comuns utilizados para o diagnóstico laboratorial da infecção por CHIKV, por serem mais fáceis de executar e mais baratos em relação aos testes moleculares, para eles são utilizados tanto em soros agudos quanto em convalescentes. Anticorpos contra o CHIKV aparecem poucos dias depois do início dos sintomas, e pode persistir por vários meses ou anos. Os primeiros anticorpos detectados em pacientes infectados pelo CHIKV durante a fase aguda são imunoglobulina M (IgM), que geralmente aparece 4-6 dias após o início dos sintomas, após 7 dias desde o aparecimento de sintomas, os anticorpos IgG tornam-se detectáveis em soros e o RNA viral tendem a desaparecer rapidamente, devido ao fim da fase de viremia (WEAVER, 2015).

O diagnóstico sorológico é baseado na detecção de anticorpos IgM e IgG, que são rápidos e fáceis de usar, seguidos por um teste sorológico de segunda linha para confirmar os resultados (KAUCHARZ, 2014;). Diversos testes sorológicos foram desenvolvidos e a grande maioria mostra alta confiabilidade e especificidade. As técnicas sorológicas frequentemente utilizadas para o diagnóstico do CHIKV são os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) e a imunofluorescência indireta (IFA) (GAIBANI *et al.*, 2016).

Figura XIII Algoritmo para o diagnóstico da infecção aguda pelo vírus Chikungunya (Adaptado de GAIBANI *et al.*, 2016).



V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

V.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram convidados a participar do estudo um total de 230 pacientes com quadro agudo de arbovirose admitidos em Unidades de Emergência dos municípios de Campo Formoso-BA, Senhor do Bonfim-BA, Itabuna-BA e Maranguape-CE, durante os anos de 2016 e 2017.

Entre os pacientes com suspeita de arboviroses foram recrutados indivíduos de qualquer idade, com exantema maculopapular e/ou febre associado a um dos seguintes sinais e sintomas: prurido cutâneo, artrite, artralgia, cefaleia, mialgia e dor retro ocular, de início ≤ 10 dias da data da coleta das amostras.

Os pacientes foram avaliados por médico da equipe e foi preenchido questionário específico contendo informações sobre presença e duração dos sinais e sintomas das arboviroses. A infecção por ZIKV, DENV e/ou CHIKV foi confirmada pela positividade em teste molecular e/ou sorológico para IgM, em pelo menos uma das amostras de plasma, urina ou saliva.

Como critérios de exclusão foram considerados casos com diagnóstico prévio de imunodeficiência ou em uso crônico de imunossupressor; presença de um ou mais sintomas de infecção de vias aéreas superiores, como coriza, estertoro, rinorreia e obstrução nasal de início concomitante com o quadro de febre e/ou exantema.

V.2. ÉTICA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, sob CAAE: 56910516.3.0000.5577 e número de aprovação: 1.657.324, 01 de agosto de 2016 (Anexo 1), todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).

Este trabalho foi desenvolvido sob os critérios da Regulamentação da Bioética no Brasil, Resolução 466/12, resoluções complementares do Conselho Nacional de Saúde, que determina

diretrizes em pesquisas que envolvam seres humanos, atendendo desta forma às exigências éticas e científica fundamentais e em conformidade com a Declaração de Helsinque.

V.3. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Após avaliação clínica e preenchimento do questionário, foram coletados 5 mL de sangue periférico em tubo com EDTA, os quais foram acondicionados em caixas térmicas com temperatura entre 20-25°C, e conduzidas ao laboratório para promover a separação do plasma em até 24 horas. Também foram solicitados aos indivíduos incluídos no estudo, a coleta de amostras de saliva utilizando *swab* oral e amostras de urina, sendo ambas as amostras acondicionadas em gelo seco até o transporte ao laboratório e armazenadas a -80 °C até sua utilização.

V.4. ISOLAMENTO DO RNA VIRAL

O RNA viral foi isolado utilizando os kits *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN, Alemanha) ou *Maxwell 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit* (Promega, Estados Unidos da América – EUA). Foram utilizadas 200µL de amostras de plasma, urina e saliva proveniente de *swab* oral. Para extração do *swab* oral, uma etapa anterior ao início do procedimento foi incluída: incubação em 220µL de água livre de nucleases, vórtex por 1 minuto, seguido de centrifugação por 1 minuto a 11.300rcf.

V.5. DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DO RNA VIRAL DE CHIKV, ZIKV E DENV

O RNA viral foi amplificado utilizando os kits multiplex *Triplex Real-time RT-PCR Assay* (CDC, EUA) – com a aplicação da enzima *SuperScript III Platinum One-Step RT-PCR Kit* (ThermoFisher Scientific, EUA) ou *ZDC Biomol Kit* (IBMP, Brasil). Todos os kits foram utilizados de acordo com as instruções dos fabricantes.

V.6. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA DETECÇÃO DE IgM CONTRA CHIKV, ZIKV E DENV

Foram utilizados os kits para detecção de imunoglobulina IgM anti-Chikungunya (Euroimmun, Alemanha), IgM anti-Zika (Euroimmun, Alemanha) e anti-Dengue (Panbio, EUA). Todos os kits foram utilizados de acordo com as instruções dos fabricantes.

V.7. CLASSIFICAÇÃO DE ARTRALGIA CRÔNICA

Para determinar a evolução da artralgia crônica pós-infecção por CHIKV, os pacientes foram submetidos a exame clínico por um ou dois médicos após 12 meses do início dos sintomas clínicos. Os indivíduos com infecção confirmada por CHIKV foram classificados com artralgia crônica pós-infecção por CHIKV quando relatassem episódios contínuos ou semanais de nova dor musculoesquelética ou agravamento de dor artrítica prévia (no caso de comorbidade relatada). Todos os portadores de artralgia crônica pós-infecção por CHIKV apresentavam, pela história e exame físico, um dos seguintes sintomas: artrite persistente, tenossinovite e edema. O tratamento sintomático dos sintomas agudos e crônicos foi realizado, com foco no alívio da dor.

V.8. ESCORE SHERA

O escore SHERA (www.sheracalculator.com/shera) é um sistema de pontuação projetado para prever o risco de artralgia crônica em pacientes com infecção pelo vírus Chikungunya baseado em cinco características demográficas e clínicas, coletadas durante a fase aguda da infecção por CHIKV, incluindo Sexo (feminino), Hipertensão, Edema, Dor retro orbital e Idade (> 26 anos). O escore SHERA pode prever corretamente 8 em cada 10 indivíduos infectados por Chikungunya que irão persistir com sintomas de dor articular pelo menos um ano após o início da doença.

V.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Testes paramétricos e não paramétricos foram usados de acordo com o teste de Kolmogorov-Smirnov para normalidade: teste de Mann Whitney, teste de Kruskal–Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn, teste de qui-quadrado, correlação de Spearman, correlação de Pearson. Todos foram bicaudais com nível de significância de 5% (software GraphPad Prism 9.0).

VI. RESULTADOS

VI.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA POPULAÇÃO

Durante os anos de 2016 e 2017, foram recrutados 230 pacientes com sintomas característicos de infecção por arbovírus que foram atendidos em unidades básica de saúde dos municípios de Campo Formoso e Itabuna (Bahia) e Maranguape (Ceará). Entre indivíduos inicialmente triados por conveniência, 96 pacientes foram excluídos: por dificuldade na coleta de amostra (n=4), resultado negativo na PCR para CHIKV (n=51), coinfeção com outros arbovírus (n=16) e tempos de doença maior do que 10 dias (n=25), resultando em 134 pacientes infectados exclusivamente com CHIKV com quadro agudo.

O tempo de doença médio dos pacientes recrutados foi de 5 dias, com idade média de 34 anos e composto por uma proporção maior de mulheres (65,22%). Os pacientes recrutados na cidade de Itabuna apresentaram tempo de doença estatisticamente menor (2 dias). A cidade de Campo Formoso teve uma proporção significativamente menor de testes positivos para CHIKV por RT-qPCR e maior para detecção de IgM para CHIKV e DENV (Tabela 1).

Tabela 1. Características sociodemográficas e laboratoriais dos pacientes com sintomas de infecção por arbovírus.

	Campo Formoso (n = 124)	Itabuna (n = 42)	Maranguape (n = 64)	χ^2 ou Kruskal Wallis	Total (n = 230)
Estado	Bahia	Bahia	Ceará		
Ano de recrutamento	2016	2016	2017		
Tempo de doença (dias)	6 (2-8) (n = 124)	2 (1-5) (n = 42)	6 (2-8) (n = 63)	0,0022	5 (2-8) (n = 229)
Idade (anos)	37 (20-53) (n = 121)	33 (22-40) (n = 42)	33 (21-54) (n=60)	0,4001	34 (22-51) (n = 223)
Sexo (feminino)	67,74% (84/124)	54,76% (23/42)	67,19% (43/64)	0,2891	65,22% (150/230)
RT-qPCR CHIKV	28,23% (35/124)	47,62% (20/42)	43,86% (25/57)	0,0266	35,87% (80/223)
DENV	0,81% (1/124)	0,00% (0/42)	0,00% (0/57)	0,6697	0,45% (1/223)
ZIKV	5,65% (7/124)	0,00% (0/42)	0,00% (0/57)	0,0559	3,14% (7/223)
IgM CHIKV	64,41% (76/118)	26,83% (11/41)	53,57% (30/56)	0,0002	54,42% (117/215)

DENV	1,69% (2/118)	0,00% (0/41)	12,50% (7/56)	0,0013	4,19% (9/215)
ZIKV	9,32% (11/118)	2,44% (1/41)	0,00% (0/0)	-	7,55% (12/159)

Os dados são expressos como valores medianos com intervalos interquartis ou proporção (%) com o número de pacientes entre parênteses. As diferenças estatísticas entre as localidades foram testadas usando o teste de Kruskal-Wallis ou qui-quadrado. Os testes estatísticos foram considerados significativos para valor de $p < 0,05$. N = número de pacientes. NS: não significativo.

Destes 134 pacientes, 55,38% dos casos de CHIKV testaram positivo por RT-qPCR (n=72), tendo o plasma apresentado a maior positividade (n=67) no teste molecular para detecção do CHIKV entre as amostras biológicas coletadas (Figura XIVA). Para sorologia, os indivíduos testaram positivo em 56,92% das amostras avaliadas (n=74). Apenas 12,3% foram positivos para ambos os métodos (n=16) (Figura XIVB).

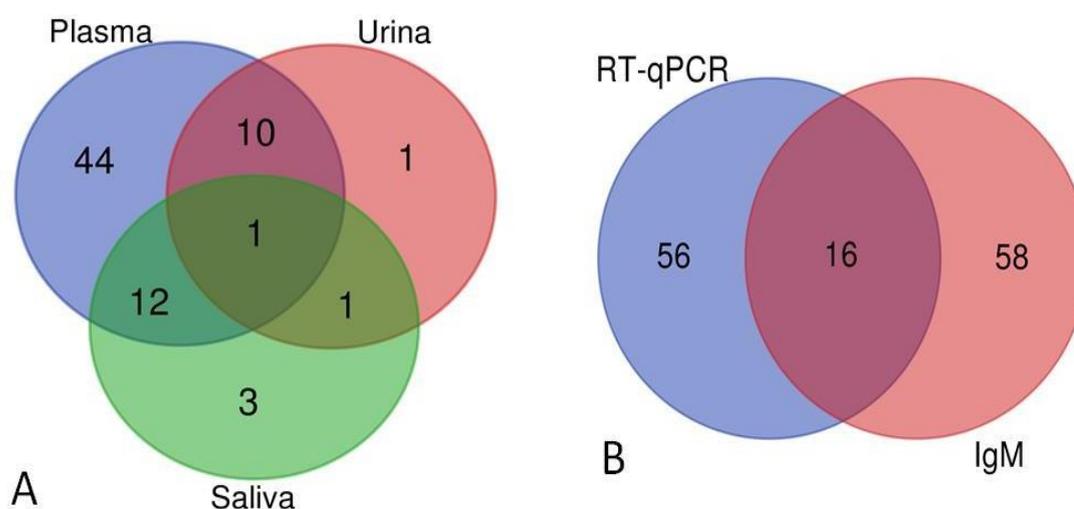


Figura XIV Testagem de RT-qPCR e IgM para CHIKV. A) Diagrama de Venn que ilustra a sobreposição na detecção do CHIKV por RT-qPCR em diferentes amostras biológicas (plasma, saliva e urina testados). B) Diagrama de Venn que ilustra a sobreposição na detecção de infecção por CHIKV por RT-qPCR versus detecção de IgM anti-CHIKV por ELISA em amostras de plasma.

Os sinais e sintomas mais prevalentes incluíram artralgia em todos os pacientes, seguido de febre (96,15%), cefaleia (89,23%), mialgia (87,69%), edema (70%), vômito (68,46%), tontura (68%), dor retro orbital (63,08%), exantema maculopapular (59,23%), prurido (54,62%), lesão oral (33,98%), além da presença de hipertensão (17,69%). Os pacientes da

cidade Maranguape apresentaram uma proporção significativamente menor de manifestação de tonturas entre os pacientes (Tabela 2).

Importante mencionar que os dados demográficos e clínicos foram similares em todos os locais de recrutamento. Um total de 107 pacientes foram reavaliados após 12 meses, pois 27 pacientes (20%) não estavam disponíveis para acompanhamento. Artralgia persistente foi detectada em 50% dos indivíduos acompanhados, e 60% dos indivíduos apresentaram escore SHERA maior que 5, também indicativo de cronicidade (Tabela 2).

Tabela 2. Características sociodemográficas e clínica dos pacientes diagnosticados com CHIKV.

	Campo Formoso (n = 75)	Itabuna (n = 24)	Maranguape (n = 31)	χ^2 ou Kruskal Wallis	Total (n = 130)
Estado	Bahia	Bahia	Ceará		
Ano de recrutamento	2016	2016	2017		
Tempo de doença (dias)	5 (2-6) (n = 75)	2 (1-3) (n = 24)	5 (2-8) (n = 31)	0,0006	4 (2-6) (n = 130)
Idade (anos)	42 (28-54) (n = 74)	31 (22-42) (n = 24)	52 (28-67) (n=30)	0,1173	40 (28-55) (n = 128)
Sexo (feminino)	64,00% (48/75)	41,67% (10/24)	64,52% (20/31)	0,1272	60,00% (78/130)
Sintomas					
Artralgia	100,00% (75/75)	100,00% (24/24)	100,00% (31/31)	-	100,00% (130/130)
Febre	96,00% (72/75)	100,00% (24/24)	93,55% (29/31)	0,4644	96,15% (125/130)
Dor de cabeça	90,67% (68/75)	95,83% (23/24)	80,65% (25/31)	0,1630	89,23% (116/130)
Mialgia	89,33% (67/75)	83,33% (20/24)	87,10% (27/31)	0,7335	87,69% (114/130)
Edema	69,33% (52/75)	54,17% (13/24)	83,87% (26/31)	0,0572	70,00% (91/130)
Vômito	66,67% (50/75)	62,50% (15/24)	77,42% (24/31)	0,4363	68,46% (89/130)
Tontura	81,33% (61/75)	58,33% (14/24)	38,46% (10/26)	0,0002	68,00% (85/125)
Dor retro orbital	65,33% (49/75)	70,83% (17/24)	51,61% (16/31)	0,2818	63,08% (82/130)
Exantema maculopapular	57,33% (43/75)	50,00% (12/24)	70,97% (22/31)	0,2557	59,23% (77/130)
Prurido	57,33% (43/75)	41,67% (10/24)	58,06% (18/31)	0,3687	54,62% (71/130)
Lesão oral	37,93% (22/58)	28,57% (4/14)	29,03% (9/31)	0,6299	33,98% (35/103)
Hipertensão	18,67% (14/75)	8,34% (2/24)	22,58% (7/31)	0,3677	17,69% (23/130)
SHERA (≥ 5)	64,00% (48/75)	45,84% (11/24)	61,29% (19/31)	0,2825	60,00% (78/130)

Persistência de artralgia por mais de 12 meses	56,14% (32/57)	26,32% (5/19)	53,85% (14/26)	0,0715	50,00% (51/102)
------------------------------------------------	-------------------	------------------	-------------------	--------	--------------------

Os dados são expressos como valores medianos com intervalos interquartis ou proporção (%) com o número de pacientes entre parênteses. As diferenças estatísticas entre as localidades foram testadas usando o teste de Kruskal-Wallis ou qui-quadrado. Os testes estatísticos foram considerados significativos para valor de $p < 0,05$. N = número de pacientes. NS: não significativo.

VI.2. COMPARAÇÃO ENTRE RT-PCR E SOROLOGIA PARA DETECÇÃO DE CHIKV AO LONGO DO TEMPO

Primeiramente, avaliamos se os diferentes materiais biológicos apresentavam diferenças de desempenho na detecção molecular ao longo do tempo, observamos que as amostras de plasma apresentam melhor detecção do vírus CHIKV em relação as amostras de saliva e urina com uma detecção positiva até o quarto dia, superior a 60% das amostras testadas. Entre o terceiro e quinto dia, aproximadamente 20,8% das amostras avaliadas foram positivas tanto na PCR quanto na avaliação sorológica (Figura XV).

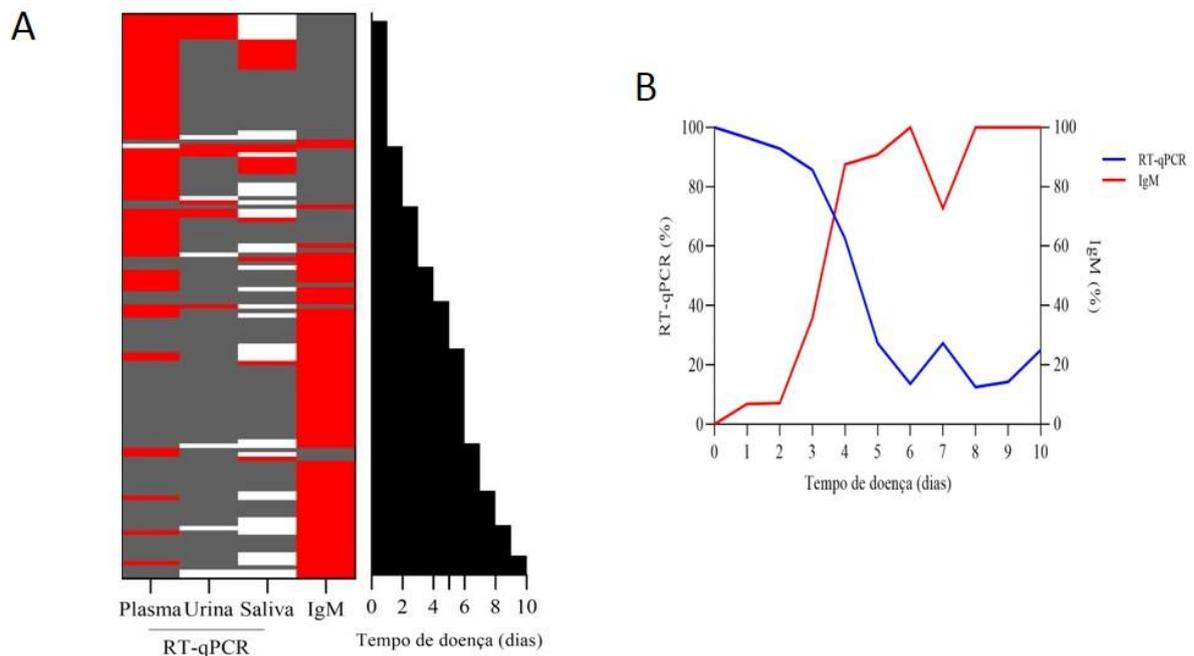


Figura XV Comparação entre diagnóstico molecular e sorológico para CHIKV. A) Mapa de calor mostrando o painel de diagnóstico molecular e sorológico de pacientes infectados exclusivamente com CHIKV, em relação ao tempo de doença. Vermelho positivo. Cinza negativo. Branco não analisado. B) Gráfico de linhas conectadas, demonstrando a prevalência de amostras positivas na RT-qPCR e IgM ao longo dos 10 primeiros dias após o surgimento dos sintomas.

VI.3. ASSOCIAÇÃO ENTRE INTENSIDADE CLÍNICA OU ARTRALGIA CRÔNICA VERSUS CARGA VIRAL (Ct) OU PRODUÇÃO DE IgM (índice)

Devido à infecção por CHIKV evoluir para um quadro de artralgia crônica e incapacitante, resolvemos comparar os resultados quantitativos obtidos realizando os ensaios moleculares (Cts = carga viral) e sorológicos (índice = resposta humoral) com os resultados obtidos com o escore SHERA (intensidade de sintomas na fase aguda) e o diagnóstico de artralgia crônica após 12 meses. Nem a carga viral (Cts), nem a resposta humoral (índice) apresentaram associação estatística com o escore SHERA ou com artralgia crônica (Figura XVI).

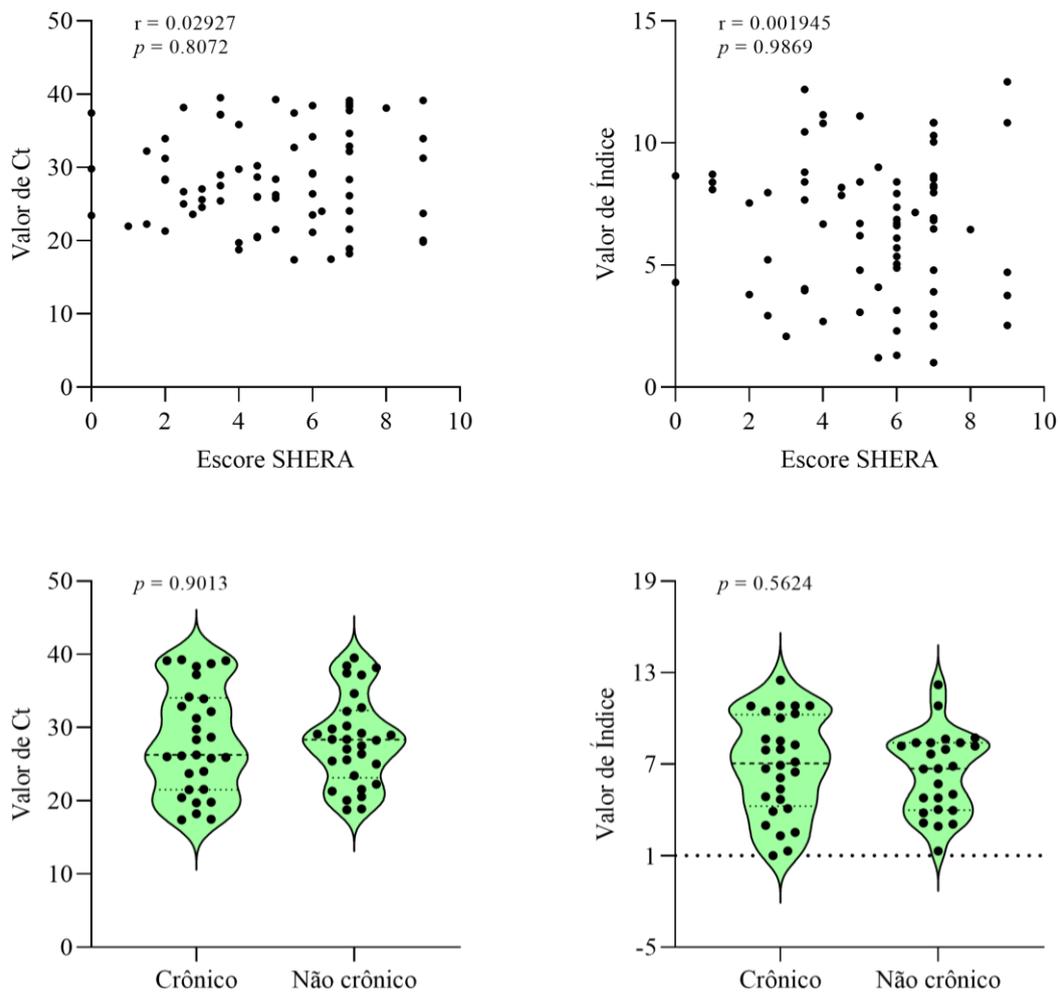


Figura XVI Ausência de associação entre intensidade clínica ou artralgia crônica versus carga viral ou produção de IgM. A-B) Gráfico de correlação entre o escore de intensidade clínica versus os níveis de carga viral (Ct) (A) ou produção de IgM (índice) (B) na fase aguda de infecção por CHIKV. C-D) Gráfico topo violino apresentando os níveis de carga viral (Ct) (C) ou a produção de IgM (índice) na fase aguda da infecção por CHIKV entre os indivíduos que desenvolveram ou não artralgia crônica ao longo de um ano de acompanhamento.

VII. DISCUSSÃO

A disseminação de arbovírus nas américas estabelece uma dificuldade em diferenciar apenas com diagnóstico clínico de cada uma das infecções, em locais onde há circulação de mais de um tipo de arbovirose, já que elas apresentam sintomatologia muito similares (RODRIGUEZ-MORALES, 2016). Atualmente o Brasil é endêmico para DENV, ZIKV e CHIKV, bem como outros arbovírus, sendo os três que circulam com maior prevalência de casos distribuídos em todo país. Estas infecções que apresentam similaridade dos sintomas na fase aguda, possuem evoluções clínicas distintas e muito graves, podendo levar a morte. Portanto, o diagnóstico diferencial é essencial para uma atuação correta no tratamento das doenças.

Por exemplo, o tratamento com corticoide, droga preferencial para tratar artralgia crônica em pacientes infectados com CHIKV, caso seja direcionada à pacientes infectados por DENV, pode aumentar significativamente a chance de dengue hemorrágica e óbito (BRASIL, 2017). Assim, o diagnóstico laboratorial diferencial é imprescindível para o melhor tratamento dos indivíduos infectados, visto que as complicações dessas infecções são diferentes entre si.

De tal modo, considerando essa importância no diagnóstico diferencial de arboviroses, este estudo demonstrou eficiência dos testes moleculares e sorológicos disponíveis para o diagnóstico de infecção por CHIKV, também definiu qual a melhor amostra biológica para realizar o teste molecular e estabeleceu a janela ideal para cada tipo de teste realizado. Ademais, demonstrou que o nível de carga viral ou resposta imune humoral não tem associação com a intensidade dos sintomas na fase aguda ou com o quadro crônico de artralgia desenvolvido pós-infecção.

Primeiramente, confirmamos que os pacientes infectados com CHIKV deste estudo apresentaram manifestações típicas da fase aguda em consonância com os primeiros relatos da doença descritos por ROSS (1956) e com os relatos mais amplos da sintomatologia clínica e do curso da doença descritos na literatura por CUNHA (2017), PAIXÃO (2018), GALATE *et al.*, (2016); HOCHEDÉZ *et al.*, (2006); HORCADA; DÍAZ-CALDERÓN; GARRIDO, (2014); SAÚDE BRASIL, (2015); TAUBITZ *et al.*, (2007). Além das manifestações típicas, alguns pacientes do nosso estudo também apresentaram manifestações atípicas da infecção por

CHIKV, como manifestações muco cutâneas e lesões orais, achados que estão em consonância com o estudo de DEEBA (2019), no qual 38% dos pacientes desenvolveram úlcera oral.

Relatamos em nossa coorte 50% de artralgia crônica por mais de 1 ano. Segundo ANDRADE (2010), SIMON (2011), MORO (2012), RAHIM (2016) e HUIITS (2018) a infecção por CHIKV pode progredir para uma fase crônica entre 50-70% dos pacientes infectados causando dores musculares e artralgias persistentes por períodos que variam de meses a anos. Finalmente, a nossa aplicação do SHERA, score desenvolvido por nosso grupo, neste estudo, foi possível identificar 60% dos pacientes que possuíam alta chance de desenvolver artralgia crônica, concordante com os 50% dos indivíduos com persistência confirmada de artralgia por mais de 12 meses.

Em seguida, avaliamos quando seria o tempo ideal e o melhor tipo de amostra para aplicar cada teste diagnóstico, comparando estratégias de diagnóstico direta (RT-qPCR) vs. indireta (sorologia para IgM). Nossos ensaios de biologia molecular apresentaram um melhor desempenho em amostras de plasma até o dia 4 de sintomas. Não há na literatura até o momento, estudo que compare diferentes tipos de amostras biológicas e seu desempenho na detecção molecular do CHIKV, nosso estudo conseguiu avaliar o desempenho dos diferentes tipos de materiais biológicos coletados e seu desempenho na análise molecular. Em relação aos ensaios sorológicos, o melhor desempenho foi a partir do dia 4 após infecção, com valores crescentes de detecção a partir do 10 dia até o terceiro mês.

Esses achados são similares aos descritos por YAP (2010), que observou 70% de detecção de IgM em amostras a partir do dia 4 de início dos sintomas. Já JOHNSON (2016) observou a detecção de IgM anti-CHIKV a partir do dia 6 após o início dos sintomas. Em geral, foi observado que as amostras coletadas durante a primeira semana de sintomas são mais adequadas para o teste molecular, assim como o soro em fase convalescente continua sendo indicado para o diagnóstico sorológico.

Por fim, observamos que a quantificação de IgM e o nível de carga viral (Ct), não estão relacionados a intensidade de sintomas na fase aguda, (SHERA) nem a evolução da infecção para artralgia crônica. Alguns estudos buscaram avaliar se havia alguma associação entre os níveis de IgM e a progressão da infecção, mas até o momento não foi encontrada associação significativa, corroborando com os nossos achados. Já GRIVARD (2007) demonstrou a presença de RNA de CHIKV em diferentes tipos teciduais de pacientes com artralgia crônica

previamente infectados por CHIKV, mas o estudo não foi capaz de definir se a presença de RNA viral no tecido está associada a progressão da doença.

Diante do exposto, o uso de ferramentas de diagnóstico clínico e laboratorial de arboviroses é chave para o manejo e acompanhamento mais adequado dos pacientes. Aqui demonstramos quando, em dias de infecção, e qual o melhor tipo de amostras para o diagnóstico molecular e imunológico do CHIKV. Porém, a alta taxa de pessoas que desenvolvem a forma crônica de CHIKV realça a importância de estudos de ferramentas, como a SHERA, que aplicadas na fase aguda da infecção, sejam capazes de prever o desenvolvimento da forma crônica.

VIII. CONCLUSÕES

Esse estudo demonstrou a eficiência dos testes de diagnóstico molecular e sorológico disponíveis para detecção de CHIKV, definindo o melhor tipo de amostra, a janela de detecção ideal, e o melhor método de acordo com tempo de doença, informações necessárias para um diagnóstico eficiente e rápido. Também demonstrou a importância de ferramentas como o SHERA, para a predição de indivíduos que podem cornificar após infecção por CIKV.

O monitoramento contínuo da disseminação das arboviroses no Brasil e no estado da Bahia em especial é necessário, visto que a infecção pode causar doenças mais graves e o desenvolvimento de quadros crônicos de comprometimento motor, impedindo a realização das atividades laborais e piorando a qualidade de vida dos indivíduos infectados.

Mais estudos devem ser realizados a fim de acompanhar a disseminação de CHIKV é importante para manter o controle da infecção no território, com a entrada de novos outros Alphavírus, como por exemplo o vírus Mayaro, é necessário manter atenção aos métodos de diagnóstico utilizado para avaliar seus desempenhos em relação a especificidade.

SUMMARY

Introduction: Since 2014, three arboviruses, Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) and Zika (ZIKV), co-circulate in Brazil causing large seasonal outbreaks. The clinical presentation of ZIKV, DENV, and CHIKV infections in the acute phase is similar, including fever, myalgia, maculopapular rash, pruritus, arthralgia, and arthritis. However, the clinical course and the risk of complications are quite different, so the differential diagnosis is essential for the best treatment and control of the diseases. **Objectives:** Create a biorepository and improve the diagnosis of cases of acute CHIKV infection in the state of Bahia. **Material and Methods:** Cohort study carried out with 230 individuals from two cities in the state of Bahia and one in Ceará with a clinical condition suspected of arbovirus infection in 2016 and 2017. Clinical and epidemiological data were collected through a questionnaire and clinical evaluation at local health posts, the SHERA prediction score was applied during the clinical evaluation. Saliva, blood and urine samples were collected, all samples were tested in RT-qPCR for confirmation of infection, and plasma was tested with IgM ELISA. All monoinfected patients with disease duration <10 days were kept in the study and reevaluated after 12 months. **Results:** We observed within the cohort that 50% of the patients evolved to chronic arthralgia in the evaluation after 12 months of infection, the most present symptoms were arthralgia, myalgia and headache, approximately 34% of the individuals had oral lesions resulting from the infection. In the molecular evaluation 35.87% were positive for CHIKV, 0.45% for DENV, 3.14% for ZIKV, in the serological analysis 54.42% were positive for CHIKV, 7.55% for ZIKV and 4.19% for DENV. The sample with the best performance for molecular detection was plasma. There was no significant difference between the PCR kits used. The best time for molecular detection observed was up to the 5th day of disease, and for serology from the 4th day onwards. There was no significant correlation between viral load and IgM index and progression to chronic arthralgia. **Conclusions:** This work demonstrated the best time for testing, which method has the best performance and the ideal sample to be used for the detection of CHIKV in patients with suspected arbovirus infection. The evolution to chronic conditions was observed in half of the individuals tested, demonstrating the need for differential diagnosis and monitoring by the health system.

Keywords: 1. Chikungunya virus; 2. Diagnosis; 3. Arbovirus; 4. Real-time RT-qPCR; 5. Arthralgia; 6. Zika; 7. Dengue.

REFERÊNCIAS

- AN, W. *et al.* Recent progress on chikungunya virus research. **Virologica Sinica**, v. 32, n. 6, p. 441–453, 28 dez. 2017.
- ARAUJO, L. M.; FERREIRA, M. L. B.; NASCIMENTO, O. J. M. Guillain-Barré syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 74, n. 3, p. 253–5, mar. 2016.
- ARIAS-GOETA, C., MOUTAILLER, S., MOUSSON, L., ZOUACHE, K., THIBERGE, J.-M., CARO, V., ROUGEON, F., & FAILLOUX, A.-B. Chikungunya virus adaptation to a mosquito vector correlates with only few point mutations in the viral envelope glycoprotein. **Infection. Genetics and Evolution**, 24, 116–126, 2014.
- BRASIL. Boletim Epidemiológico Vol.53 nº1-arbo2021. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2021.
- BRASIL. Chikungunya: manejo clínico. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2017.
- BURT, F. J. *et al.* Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. e107–e117, 2017.
- CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1885–1886, 2015.
- CAO-LORMEAU, V.-M. *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531–9, abr. 2016.
- CARDOSO, C. W., KIKUTI, M., PRATES, A. P. P. B., *et al.* Unrecognized Emergence of Chikungunya Virus during a Zika Virus Outbreak in Salvador, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 11(1), e0005334, 2017.
- CARRASCO, L., SANZ, M.; GONZÁLEZ-ALMELA, E. The Regulation of Translation in Alphavirus-Infected Cells. **Viruses**, 10(2), 70, 2018.
- CAVRINI F, GAIBANI P, PIERRO AM, ROSSINI G, LANDINI MP, SAMBRI V. Chikungunya: an emerging and spreading arthropod-borne viral disease. **J Infect Dev Ctries** 3:744–752, 2009.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Areas at Risk for Chikungunya**. [www.cdc.gov](https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html). 2022. URL: <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>. Acesso em: Dezembro/2021.
- CHEN, R. *et al.* Chikungunya Virus 3' Untranslated Region: Adaptation to Mosquitoes and a Population Bottleneck as Major Evolutionary Forces. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 8, 2013.

- COSTA, F. *et al.* Emergence of Congenital Zika Syndrome: Viewpoint From the Front Lines. **Annals of Internal Medicine**, v. 164, n. 10, p. 689, 2016.
- COUCEIRO, F. DE A. V., FURTADO, F. K. M., GUEDES, G. DE S., *et al.* Epidemiologia da Chikungunya no Brasil: contexto socioeconômico e sanitário entre 2017 e 2021. **Research, Society and Development**, 11(7), e46611730331, 2022.
- CUNHA, R. V. DA; TRINTA, K. S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, 112(8), 523–531, 2017.
- CUNHA, R. V., TRINTA, K. S., MONTALBANO, C. A., SUCUPIRA, M. V. F., DE LIMA, M. M., MARQUES, E., ROMANHOLI, I. H.; CRODA, J. Seroprevalence of Chikungunya Virus in a Rural Community in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 11(1), e0005319, 2017.
- DALASTRA, M.; BATISTELA MOREIR, M. A. Euthanasia for the Zoonosis Control Program. In: Euthanasia - The “Good Death” Controversy in Humans and Animals. [s.l.] **InTech**, 2011.
- DE ANDRADE DC, JEAN S, CLAVELOU P, DALLEL R, BOUHASSIRA D. Chronic pain associated with the Chikungunya Fever: long lasting burden of an acute illness. **BMC Infectious Diseases**. 2010.
- DE MORAES, L. *et al.* A clinical scoring system to predict long-term arthralgia in Chikungunya disease: A cohort study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 7, p. e0008467, 2020.
- DE PAULA FREITAS, B. *et al.* Glaucoma and Congenital Zika Syndrome. **Ophthalmology**, v. 124, n. 3, p. 407–8, 2017.
- DEEBA F, HAIDER MSH, AHMED A, *et al.* Global transmission and evolutionary dynamics of the Chikungunya virus. **Epidemiol Infect**;148:e63, 2020.
- DONALISIO, M. R., FREITAS, A. R. R., & ZUBEN, A. P. B. VON. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, 51(0), 2017.
- FARIA, N. R. *et al.* Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014-2015. **PLoS Currents**, 2016.
- FIGUEIREDO, M. L. G. DE, & FIGUEIREDO, L. T. M. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 47(6), 677–683, 2014.
- FIGUEIREDO, M. L. G. DE; FIGUEIREDO, L. T. M. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 47(6), 677–683, 2014.
- FROS, J.; PIJLMAN, G. Alphavirus Infection: Host Cell Shut-Off and Inhibition of Antiviral Responses. **Viruses**, 8(6), 166, 2016.

GALATE, L. B., AGRAWAL, S. R., SHASTRI, J. S.; LONDHEY, V. Chikungunya Fever Among Patients with Acute Febrile Illness Attending a Tertiary Care Hospital in Mumbai. **Journal of Laboratory Physicians**, 8(02), 085–089, 2016.

GÉRARDIN, P., GUERNIER, V., PERRAU, J., FIANU, A., LE ROUX, K., GRIVARD, P., MICHAULT, A., DE LAMBALLERIE, X., FLAHAULT, A.; FAVIER, F. Estimating Chikungunya prevalence in La Réunion Island outbreak by serosurveys: Two methods for two critical times of the epidemic. **BMC Infectious Diseases**, 8(1), 99, 2008.

GRIVARD P, LE ROUX K, LAURENT P, *et al.* Molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection. **Pathol Biol (Paris)** ;55(10):490-494, 2007.

HERNANDEZ, R., BROWN, D. T., & PAREDES, A. Structural Differences Observed in Arboviruses of the Alphavirus and Flavivirus Genera. **Advances in Virology**, 1–24, 2014.

HIGGS, S. How do mosquito vectors live with their viruses?. In *Microbe-vector Interactions in Vector-borne Diseases* (pp. 103–138). **Cambridge University Press**, 2001.

HOCHEDÉZ, P., JAUREGUIBERRY, S., DEBRUYNE, M., BOSSI, P., HAUSFATER, P., BRUCKER, G., BRICAIRE, F.; CAUMES, E. Chikungunya Infection in Travelers. **Emerging Infectious Diseases**, 12(10), 1565–1567, 2006.

HOLLIDGE, B. S., GONZÁLEZ-SCARANO, F., & SOLDAN, S. S. Arboviral Encephalitides: Transmission, Emergence, and Pathogenesis. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, 5(3), 428–442, 2010.

HORCADA, M. L., DÍAZ-CALDERÓN, C.; GARRIDO, L. Fiebre chikungunya. Manifestaciones reumáticas de una infección emergente en Europa. **Reumatología Clínica**, 11(3), 161–164, 2015.

JOHNSON BW, GOODMAN CH, HOLLOWAY K, DE SALAZAR PM, VALADERE AM, DREBOT MA. Evaluation of Commercially Available Chikungunya Virus Immunoglobulin M Detection Assays. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**;95(1):182-192, 2016.

JOSSERAN, L., PAQUET, C., ZEHGNOUN, A., CAILLERE, N., LE TERTRE, A., SOLET, J.-L.; LEDRANS, M. Chikungunya Disease Outbreak, Reunion Island. **Emerging Infectious Diseases**, 12(12), 1994–1995, 2006.

KHAN, A. H., MORITA, K., PARQUET, M. DEL C., HASEBE, F., MATHENGE, E. G. M, IGARASHI, A. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **Journal of General Virology**, 83(12), 3075–3084, 2002.

KIKUTI, M., TAURO, L. B., MOREIRA, P. S. S., NASCIMENTO, L. C. J., PORTILHO, M. M., SOARES, G. C., WEAVER, S. C., REIS, M. G., KITRON, U.; RIBEIRO, G. S. Evaluation of two commercially available chikungunya virus IgM enzyme-linked immunoassays (ELISA) in a setting of concomitant transmission of chikungunya, dengue and Zika viruses. **International Journal of Infectious Diseases**, 91, 38–43, 2020.

KUCHARZ EJ, CEBULA-BYRSKA I, Chikungunya fever. **Eur J Intern Med** 23:325–329, 2014.

- KUMAR, A., MAMIDI, P., DAS, I., NAYAK, T. K., KUMAR, S., CHHATAI, J., CHATTOPADHYAY, S., SURYAWANSHI, A. R.; CHATTOPADHYAY, S. A Novel 2006 Indian Outbreak Strain of Chikungunya Virus Exhibits Different Pattern of Infection as Compared to Prototype Strain. **PLoS ONE**, 9(1), e85714, 2014.
- LANCIOTTI, R. S., KOSOY, O. L., LAVEN, J. J., PANELLA, A. J., VELEZ, J. O., LAMBERT, A. J.; CAMPBELL, G. L. Chikungunya Virus in US Travelers Returning from India, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, 13(5), 764–767, 2007.
- LEPARC-GOFFART, I. *et al.* Chikungunya in the Americas. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 514, 2014.
- LUM, F.-M., NG, L.F.P. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. **Antiviral Res**, 2015.
- MCPHERSON, R. L., ABRAHAM, R., SREEKUMAR, E., ONG, S.-E., CHENG, S.-J., BAXTER, V. K., KISTEMAKER, H. A. V., FILIPPOV, D. V., GRIFFIN, D. E.; LEUNG, A. K. L. ADP-ribosylhydrolase activity of Chikungunya virus macrodomain is critical for virus replication and virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 114(7), 1666–1671, 2017.
- MORO ML, GRILLI E, CORVETTA A, *et al.* Long-term chikungunya infection clinical manifestations after an outbreak in Italy: a prognostic cohort study. **Journal of Infect**;65(2):165-172, 2012.
- MORRISON, T. E. Reemergence of Chikungunya Virus. **Journal of Virology**, 88(20), 11644–11647, 2014.
- MOTA, M. T. DE O. *et al.* Mosquito-transmitted viruses – the great Brazilian challenge. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 38–50, dez. 2016.
- MUSSO, D. *et al.* Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 14, p. 20761, abr. 2014.
- MUSSO, D., & GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clinical Microbiology Reviews**, 29(3), 487–524, 2016.
- NUNES, M. R. T. *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 102, 2015.
- PAIXÃO, E. S., TEIXEIRA, M. G.; RODRIGUES, L. C. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. **BMJ Global Health**, 3(Suppl 1), e000530, 2018.
- PAPLOSKI, I. A. D. *et al.* Time Lags between Exanthematous Illness Attributed to Zika Virus, Guillain-Barré Syndrome, and Microcephaly, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 8, p. 1438–1444, ago. 2016.
- PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. Western. **Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 6, p. 671–9, nov. 2016.

- PETERSEN, L. R. *et al.* Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552–63, abr. 2016.
- POTTS, J. A.; ROTHMAN, A. L. Clinical and laboratory features that distinguish dengue from other febrile illnesses in endemic populations. **Tropical Medicine & International Health**, v. 13, n. 11, p. 1328–40, nov. 2008.
- POWERS, A. M., BRAULT, A. C., TESH, R. B.; WEAVER, S. C. Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. **Microbiology**, 81(2), 471–479, 2000.
- RAHIM AA, THEKKEKARA RJ, BINA T, PAUL BJ. Disability with Persistent Pain Following an Epidemic of Chikungunya in Rural South India. **Journal Rheumatol**; 43(2):440-444, 2016.
- RAUSALU, K., UTT, A., QUIRIN, T., VARGHESE, F. S., ŽUSINAITE, E., DAS, P. K., AHOLA, T.; MERITS, A. Chikungunya virus infectivity, RNA replication and non-structural polyprotein processing depend on the nsP2 protease's active site cysteine residue. **Scientific Reports**, 6, 2016.
- RODRIGUEZ-MORALES, A. J., VILLAMIL-GÓMEZ, W. E., & FRANCO-PAREDES, C. The arboviral burden of disease caused by co-circulation and co-infection of dengue, chikungunya and Zika in the Americas. **Travel Medicine and Infectious Disease**, 14(3), 177–179, 2016.
- ROSS, R. W. The Newala epidemic: III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **Journal of Hygiene**, 54(2), 177–191, 1956.
- RÜCKERT, C., WEGER-LUCARELLI, J., GARCIA-LUNA, S. M., *et al.* Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. **Nature Communications**, 8(1), 15412, 2017.
- RUPP, J. C., SOKOLOSKI, K. J., GEBHART, N. N., & HARDY, R. W. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. **Journal of General Virology**, 96(9), 2483–2500, 2015.
- SALVADOR, F. S.; FUJITA, D. M. Entry routes for Zika virus in Brazil after 2014 world cup: New possibilities. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 14, n. 1, p. 49–51, jan. 2016.
- SANTIAGO, G. A. *et al.* Performance of the Triplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue, and chikungunya viruses. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.
- SARNO, M. *et al.* Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004517, 2016.
- SCHNETTLER, E. *et al.* RNA Interference Targets Arbovirus Replication in Culicoides Cells. **Journal of Virology**, 87(5), 2441–2454, 2013.
- SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. In **Nature Reviews Microbiology** (Vol. 8, Issue 7, pp. 491–500), 2010.

SERGON K, NJUGUNA C, KALANI R, *et al.* Seroprevalence of Chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 2008.

SERGON K, YAHAYA AA, BROWN J, *et al.* Seroprevalence of Chikungunya virus infection on Grande Comore Island, union of the Comoros, 2005. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 2007.

SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **Journal of Clinical Investigation,** 127(3), 737–749, 2017.

SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **Journal of Clinical Investigation,**127(3), 737–749, 2017.

SILVA, M. M. O., TAURO, L. B., KIKUTI, M., ANJOS, R. O., *et al.* Concomitant Transmission of Dengue, Chikungunya, and Zika Viruses in Brazil: Clinical and Epidemiological Findings From Surveillance for Acute Febrile Illness. **Clinical Infectious Diseases,** 69(8), 1353–1359, 2019.

SIMON F, JAVELLE E, OLIVER M, LEPARC-GOFFART I, MARIMOUTOU C. Chikungunya virus infection. **Current Infectious Disease Reports.**13(3):218-228, 2011.

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

SREEJITH, R., RANA, J., DUDHA, N., KUMAR, K., GABRANI, R., SHARMA, S. K., GUPTA, A., VRATI, S., CHAUDHARY, V. K.; GUPTA, S. Mapping interactions of Chikungunya virus nonstructural proteins. **Virus Research,**169(1), 231–236, 2012.

STAPLES, J. E., BREIMAN, R. F.; POWERS, A. M. Chikungunya Fever: An Epidemiological Review of a Re-Emerging Infectious Disease. **Clinical Infectious Diseases,**49(6), 942–948, 2009.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiological Review,** 58 (3), 491–562, 1994.

TAUBITZ, W., CRAMER, J. P., KAPAUN, A., PFEFFER, M., DROSTEN, C., DOBLER, G., BURCHARD, G. D.; LOSCHER, T. Chikungunya Fever in Travelers: Clinical Presentation and Course. **Clinical Infectious Diseases,** 45(1), e1–e4, 2007.

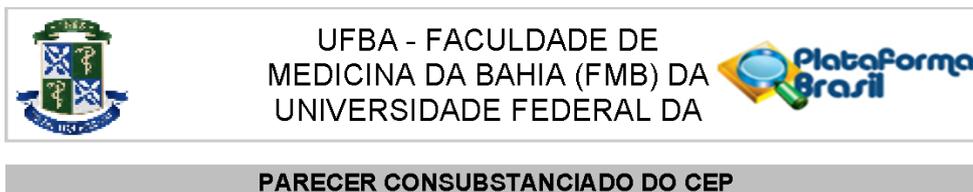
THIBERVILLE, S.-D., MOYEN, N., DUPUIS-MAGUIRAGA, L., NOUGAIREDE, A., GOULD, E. A., ROQUES, P.; DE LAMBALLERIE, X. Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Research,** 99(3), 345–370, 2013.

TSETSARKIN, K. A. *et al.* A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS Pathogens,** v. 3, n. 12, p. 1895–1906, 2007.

TSETSARKIN, K. A., CHEN, R., SHERMAN, M. B.; WEAVER, S. C. Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence. **Current Opinion in Virology,**1(4), 310–317, 2011.

- UTT, A., DAS, P. K., VARJAK, M., LULLA, V., LULLA, A.; MERITS, A. Mutations Conferring a Noncytotoxic Phenotype on Chikungunya Virus Replicons Compromise Enzymatic Properties of Nonstructural Protein 2. **Journal of Virology**, 89(6), 3145–3162, 2015.
- VIEIRA, C. J. DA S. P., SILVA, D. J. F. DA, BARRETO, E. S., *et al.* Detection of Mayaro virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. **Acta Tropica**, 147, 12–16, 2015.
- VINHAES, E. S. *et al.* Transient Hearing Loss in Adults Associated with Zika Virus Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 0, n. 5, p. ciw770, 2016.
- VOLK, S. M. *et al.* Genome-Scale Phylogenetic Analyses of Chikungunya Virus Reveal Independent Emergences of Recent Epidemics and Various Evolutionary Rates. **Journal of Virology**, v. 84, n. 13, p. 6497–6504, 2010.
- VOSS, J. E., VANEY, M.-C., DUQUERROY, S., VONRHEIN, C., GIRARD-BLANC, C., CRUBLET, E., THOMPSON, A., BRICOGNE, G.; REY, F. A. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, 468(7324), 709–712, 2010.
- WEAVER SC, LECUIT M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito borne disease. **N Engl J Med** 372:1231–1239, 2015.
- WEAVER, S. C., & REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, 85(2), 328–345, 2010.
- WEINBREN, M. P., HADDOW, A. J.; WILLIAMS, M. C. The occurrence of chikungunya virus in Uganda I. Isolation from mosquitoes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 52(3), 253–262, 1958.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chikungunya**. www.who.int. 2020. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>. Acesso em: Dezembro/2021.
- YAP, M. L., KLOSE, T., URAKAMI, A., HASAN, S. S., AKAHATA, W.; ROSSMANN, M. G. Structural studies of Chikungunya virus maturation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 114(52), 13703–13707, 2017.
- ZANLUCA, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

ANEXO 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Assinatura molecular na infecção por ZIKV

Pesquisador: Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56910516.3.0000.5577

Instituição Proponente: FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA

Patrocinador Principal: FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS - FINEP

DADOS DO PARECER

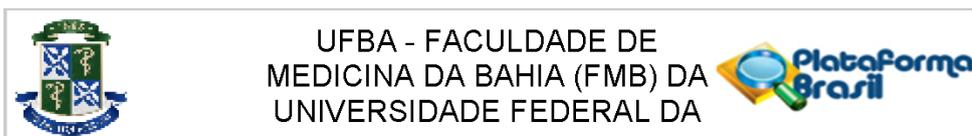
Número do Parecer: 1.657.324

Apresentação do Projeto:

Durante a epidemia de arboviroses no Brasil (ZIKV, DENV, CHIKV), um dos principais problemas é tentar distinguir os três possíveis agentes infecciosos durante a fase aguda de infecção. Na fase inicial não é possível realizar o diagnóstico diferencial considerando apenas os aspectos clínicos. A apresentação clínica clássica da infecção pelo ZIKV inclui febre, rash maculopapular, cefaléia, artralgia, atrite e mialgia. Esses sintomas são facilmente confundidos com os da infecção pelo DENV e CHIKV. Ademais, o ZIKV pertence à mesma família do DENV e do vírus da Febre Amarela, apresentando uma alta similaridade genotípica e fenotípica entre eles, dificultando o desenvolvimento de testes moleculares e imunológicos específicos com baixa reação cruzada entre flavivírus. Há a hipótese que existe uma assinatura biológica capaz de distinguir casos de DENV, CHIKV e ZIKV. Apesar de possuírem formas clínicas aguda muito similares essas três arboviroses apresentam fases crônicas distintas. O vírus CHIKV está fortemente associado à inflamações nas articulações, o vírus Zika está associado a doenças neurológicas e o vírus da dengue está associado a doenças hemorrágicas. Estes desfechos indicam a capacidade de infectar grupos celulares específicos e mecanismos patogênicos diferentes, justificando a investigação de assinaturas moleculares particulares a cada arbovirose.

Trata-se de um estudo de corte transversal observacional onde de 300 participantes com quadro

Endereço: Largo do Terreiro de Jesus, s/n
Bairro: PELOURINHO **CEP:** 40.026-010
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3283-5564 **Fax:** (71)3283-5567 **E-mail:** cepfmb@ufba.br



Continuação do Parecer: 1.657.324

agudo de arbovirose admitidos em Unidades de saúde de Campo Formoso, Senhor do Bonfim, Itabuna e Vitória da Conquista e 50 indivíduos participantes sadios provenientes dessas regiões sem história de doença exantemática ou febre nos últimos 6 meses serão obtidos dados clínico-epidemiológicos e amostras de urina, sangue e saliva. Serão coletados 18 ml de sangue total em heparina e 2ml em EDTA, amostra de urina e saliva por swab oral. As amostras de sangue serão acondicionadas em gelo seco e armazenadas em freezers a -80C até a extração do RNA. Após a separação em gradiente de ficol, as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) serão congeladas em nitrogênio líquido até utilização nos ensaios de microarranjo, citometria de fluxo e nanostring. Aliquotas de plasma serão armazenadas para análise de marcadores sorológicos solúveis. Extração do RNA e PCR em tempo Real - Serão coletadas amostras de plasmas em tubos de EDTA para o diagnóstico molecular na Fiocruz- Bahia.

Objetivo da Pesquisa:

PRIMÁRIO

Caracterizar e prever o valor diagnóstico da assinatura transcriptômica nas células do sangue periférico de pacientes infectados com ZIKV durante a fase aguda de infecção.

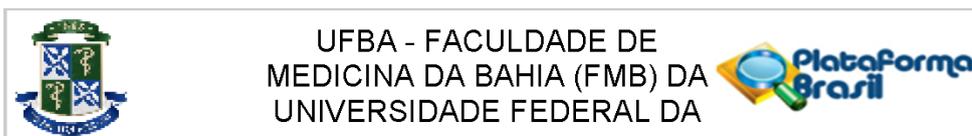
SECUNDÁRIO:

1. Realizar ensaios de microarranjos de células mononucleares de sangue periférico de pacientes infectados com ZIKV, CHIKV ou DENV com diagnóstico clínico e laboratorial;
2. Descrever o perfil fenotípico de células mononucleares de sangue periférico de pacientes infectados com ZIKV, CHIKV ou DENV com diagnóstico clínico e laboratorial;
3. Identificar biomarcadores plasmáticos solúveis de pacientes infectados com ZIKV, CHIKV ou DENV com diagnóstico clínico e laboratorial;
4. Desenvolver um kit de diagnóstico para arboviroses combinando a detecção do material genético viral e de moléculas humanas expressas específicas para cada arbovirose.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Endereço: Largo do Terreiro de Jesus, s/n
Bairro: PELOURINHO **CEP:** 40.026-010
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3283-5564 **Fax:** (71)3283-5567 **E-mail:** cepfmb@ufba.br



Continuação do Parecer: 1.657.324

“Há possibilidade de quebra de confidencialidade na revisão de prontuários. Para evitar esse risco, a identidade dos indivíduos será preservada através de codificação em banco de dados para identificação de cada sujeito da pesquisa. Adicionalmente, os dados serão manipulados apenas pela equipe de pesquisa, a qual se compromete a utilizá-los exclusivamente para a pesquisa sem divulgar nomes ou quaisquer dados que identifique o participante. Há risco também da formação de pequeno hematoma no local da punção venosa para coleta das amostras de sangue. Para evitar acidentes de punção venosa, o procedimento será realizado por profissionais capacitados e experientes em sua execução.”

BENEFÍCIOS

“Os indivíduos não receberão qualquer tipo de benefício para participar do estudo. Os resultados do estudo podem contribuir, entretanto, para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e preventivas para o controle da infecção pelo vírus Zika.”

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo observacional que tem como objetivo identificar as diferentes assinaturas moleculares e de resposta à agressão viral para as diversas arboviroses prevalentes na Bahia. Bem argumentado. ÉTICO.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE: contém justificativa, objetivos, procedimentos, desconfortos e riscos, manutenção do sigilo e da privacidade plena liberdade de recusar-se a participar, benefícios esperados, endereço do cep para dúvidas. ADEQUADO.

ORÇAMENTO: R\$ 705.000,00. FINEO –ADEQUADO.

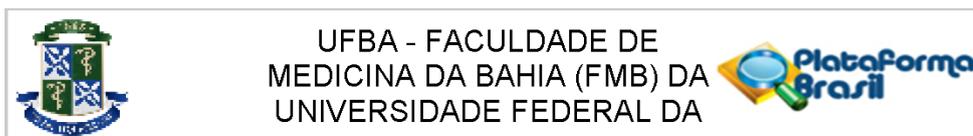
Cronograma: ADEQUADO.

Carta de confidencialidade dos participantes: anexada do assistente Vitor Rigaud. Um projeto desta envergadura parece estar carente de mais colaboradores. ADEQUADA.

Contrapartida da instituição: parcamente anotada. ADEQUADA.

Cartas de anuências: anexadas anuências das instituições (Senhor do Bonfim, Vitória da Conquista,

Endereço: Largo do Terreiro de Jesus, s/n
Bairro: PELOURINHO **CEP:** 40.026-010
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3283-5564 **Fax:** (71)3283-5567 **E-mail:** cepfmb@ufba.br



Continuação do Parecer: 1.657.324

Itabuna e Campo Formoso - ADEQUADAS) que participarão coletando as amostras. A instituição onde os procedimentos de laboratório (FioCruz-Salvador) serão realizados. ADEQUADA.

Recomendações:

O TCLE contém o LOGO da FioCruz, o investigador principal, porém apesar de ser da FioCruz submete e aprova projeto pela Faculdade de Medicina da Bahia, sugere-se adequar.

O TCLE está em 2 páginas: sugere-se que transforme em uma página somente para que fique clara a assinatura do compromisso completo; ou frente e verso.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

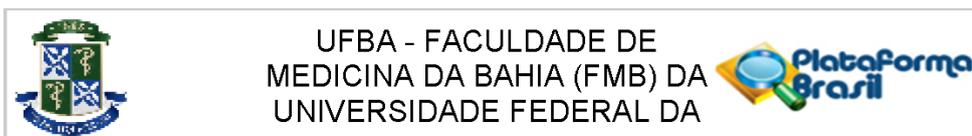
-O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. 466/12 CNS/MS) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

-O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. 466/12 CNS/MS), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata. No cronograma, observar que o início do estudo somente poderá ser realizado após aprovação pelo CEP, conforme compromisso do pesquisador com a resolução 466/12 CNS/MS.

-O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - junto com seu posicionamento.

-Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Endereço: Largo do Terreiro de Jesus, s/n
Bairro: PELOURINHO **CEP:** 40.026-010
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3283-5564 **Fax:** (71)3283-5567 **E-mail:** cepfmb@ufba.br



Continuação do Parecer: 1.657.324

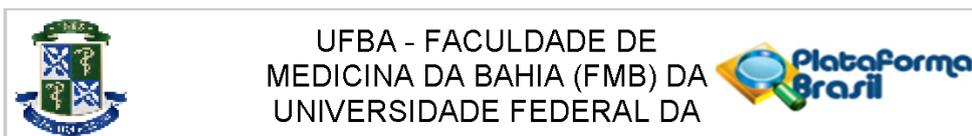
-Relatórios PARCIAIS devem ser apresentados ao CEP SEMESTRALMENTE e FINAL na conclusão do projeto.

-Assegurar aos participantes da pesquisa os benefícios resultantes do projeto, seja em termos de retorno social, acesso aos procedimentos, produtos ou agentes da pesquisa (466/12 CNS/MS).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_707927.pdf	31/07/2016 13:11:47		Aceito
Outros	carta_anuencia_assinado.pdf	31/07/2016 13:04:40	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Outros	termo_confidencialidade_assinado.pdf	31/07/2016 13:03:15	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_zikama_v3.doc	31/07/2016 13:01:59	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Outros	anuencia_itabuna.pdf	09/06/2016 22:06:25	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Outros	anuencia_conquista.pdf	09/06/2016 22:05:25	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Outros	anuencia_campoformoso.pdf	09/06/2016 22:04:48	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Outros	anuencia_bonfim.pdf	09/06/2016 22:04:11	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Outros	TCUD_zika_assinado.docx	09/06/2016 22:03:02	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ta_zikama.doc	06/06/2016 20:19:21	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_zikama_v2.doc	06/06/2016 19:36:38	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_zikam_ass.pdf	06/05/2016 09:35:16	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado	projeto_zikama.docx	04/05/2016	Victor Nóbrega	Aceito

Endereço: Largo do Terreiro de Jesus, s/n
Bairro: PELOURINHO **CEP:** 40.026-010
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3283-5564 **Fax:** (71)3283-5567 **E-mail:** cepfmb@ufba.br



Continuação do Parecer: 1.657.324

/ Brochura Investigador	projeto_zikama.docx	12:30:09	Rigaud de Oliveira	Aceito
Outros	ficha.pdf	03/05/2016 22:59:26	Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SALVADOR, 01 de Agosto de 2016

Assinado por:
Eduardo Martins Netto
(Coordenador)

Endereço: Largo do Terreiro de Jesus, s/n
Bairro: PELOURINHO **CEP:** 40.026-010
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3283-5564 **Fax:** (71)3283-5567 **E-mail:** cepfmb@ufba.br

Research Letter

Oral lesions are frequent in patients with Chikungunya infection

Paula M. Casais, DMD, MSD^{1,2}, Kevan Akrami, MD^{1,2,3}, Thiago Cerqueira-Silva, MS^{1,2}, Laise P. Moraes, MSc^{1,2}, Victor N. Rigaud, MD², Emílio S. Neto, MD⁴, Cibele M. Orge, BBiomedSc^{1,2}, Lais C. Gusmão, BBiomedSc^{1,2}, Luciano P. Cavalcanti, PhD⁵, Luciane A. Santos, PhD¹, Manoel Barral-Netto, MD, PhD^{1,2,6}, Aldina P. Barral, MD, PhD^{1,2,6}, Ricardo Khouri, PhD^{1,2,7}, Viviane S. Boaventura , MD, PhD^{1,2,4}

¹Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Gonçalo Moniz, Laboratório de Enfermidades Transmitidas por Vetores, Salvador, BA, Brazil, ²Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Salvador, BA, Brazil, ³Division of Infectious Disease, Department of Medicine, University of California San Diego, San Diego, CA, USA, ⁴Hospital Santa Izabel, Santa Casa de Misericórdia da Bahia, Serviço de Otorrinolaringologia, Salvador, BA, Brazil, ⁵Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Saúde Comunitária, Fortaleza, CE, Brazil, ⁶Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Investigação em Imunologia (iii-INCT), Salvador, BA, Brazil, and ⁷Rega Institute for Medical Research, Department of Microbiology and Immunology, KULeuven, Leuven, Belgium

 <http://orcid.org/0000-0002-7241-6844>

To whom correspondence should be addressed. Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz. R. Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, BA 40296-710, Brazil. Email: viviane.boaventura@bahia.fiocruz.br

Submitted 21 January 2020; Revised 13 March 2020; Editorial Decision 16 March 2020; Accepted 27 March 2020

After 50 years of restriction to areas of Asia and Africa, Chikungunya outbreaks emerged in all continents in the past 20 years becoming part of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) list of traveller-related infections. As Chikungunya outbreaks increase in frequency, a wide variety of clinical manifestations related to this infection have been reported. This study aimed to characterize the oral lesions related to Chikungunya infection in a multicentre cohort in northeastern Brazil. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia (approval number: 1.657.324). Written informed consent was obtained from all participants or legal guardians.

In total, 105 individuals with acute (<10 days of disease onset) mono-chikungunya virus (CHIKV) infection were evaluated by an otolaryngologist and dentist. Chikungunya infection was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) ($n=61$) and/or specific IgM ($n=63$). Approximately 59 individuals tested positive for CHIKV by real-time PCR (RT-PCR) in serum specimens, 14 in saliva and 12 in urine specimens.

Oral lesions were detected in 21 out of 105 cases (20%) with acute CHIKV infection. Five of these individuals tested positive for CHIKV in saliva samples. Oral lesions occurred 2–6 days after disease onset. Odynophagia and/or dysphagia were reported by 20 patients. Most cases ($n=15$, 71.4%) presented isolated painful ulcers with well-circumscribed margins and erythematous halo (Figure 1). Gingival bleeding ($n=7$, 33.3%) and vesicles ($n=3$, 14.3%) were also observed, as well as edema ($n=1$, 4.8%) in marginal vestibular gum in the absence of plaque and dental caries (Figure 1). Lesions mainly affected the following locations: gingiva (43%), lips (52.4%), tongue (43%) and jugal mucosa (28.6%).

During acute infection, presence of an oral lesion was strongly associated with maculopapular rash and retroocular pain (85.7%, $P=0.025$ and 81%, $P=0.036$, respectively), suggesting a polysymptomatic profile associated with oral involvement. However, presence of oral lesion in the acute stage of infection was not related to persistent arthralgia in a follow-up period of 12 months.

© International Society of Travel Medicine 2020.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com



Figure 1. Clinical aspect and localization of oral lesions in patients with CHIKV infection. (a–d) Rounded ulcerated lesions, with circumscribed margins and halo-erythematous, in regions of hard palate (a), at the vestibular mucosa of the marginal gingiva (b and c) and at the tip of the tongue (d). (e) Vesicular-bullous lesion on the lower lip. (f) Edematous and bleeding regions in vestibular mucosa of gingiva margin of the upper central incisors.

In our study, 20% of the CHIKV-infected individuals presented with oral lesions early after disease onset, comparable with the 2.3–54.3% rate previously reported for oral lesions during acute CHIKV infection.^{1–4} Due to intense arthralgia and myalgia, patients may not spontaneously report oral complaints. The relative high incidence of painful oral lesions adversely affecting eating and drinking underpins the need for routine intrabuccal exam in patients with acute CHIKV illness.⁵ Symptomatic relief medications may help mitigate morbidity during acute CHIKV infection.

Among the oral lesions found in the present series ($n=21$), 86% were characterized as ulcers and vesicles. Painful oral ulcers in the form of aphthae-like erosions seems to be the most common oral manifestation, observed in 13.6–16% of CHIKV-infected patients and lasting 3–10 days without any sequelae.^{6–8} Detection of oral ulcer in the context of an arbovirus infection, while not a specific sign, may be suggestive of Chikungunya etiology.

Gingivorrhagia associated with gingivitis was previously described in a range of 1.4–54.4% of Chikungunya cases,^{1,3} even despite normal platelet counts.⁹ Of note, others haemorrhagic manifestations, such as skin and mucosal bleeding, were considered positive predictor of Chikungunya infection among patients with suspected arbovirus infection.¹⁰

We detected CHIKV in saliva of 27% of patients with oral involvement suggesting that lesions may result from direct viral activity. Further studies are needed to confirm this hypothesis. Additional research exploring pathological and immunological features of oral lesion may also provide

insights into the pathogenesis of Chikungunya-mediated tissue damage.

In conclusion, the presence of oral ulcers was found to be relatively common during acute CHIKV infection, resulting in pain and dysphagia that potentially increases the morbidity of this arbovirus infection.

Authors' Contributions

P.M.M.C., K.A., V.S.B., V.N. and E.S.N. performed clinical evaluation. P.M.M.C., L.P.M., C.M.O., L.P.C., L.A.S. A.P.B. and R.K. were responsible for diagnostic tests. P.M.M.C., K.A. and V.S.B. wrote the manuscript with contributions of L.P.C., A.P.B. and M.B. T.C.S. performed statistical analysis M.B., A.P.B., V.S.B. and R.K. supervised the Project. All authors provided critical feedback and helped shape the manuscript.

Funding

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (APOIO A PESQUISAS EM ANDAMENTO SOBRE VIRUS ZIKA E IMPLEMENTAÇÃO E MANUTENÇÃO DE BIOBANCOS—439967/2016—3 e PROEP420765/2017—4), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) (MCTIC/FINEP/FNDCT 01/2016 ZIKA—0416006000), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) and Programa de Pesquisa Para o SUS (PPSUS)—no. 003/2017. We declare that

funding sources had no role in the study design, data collection, data interpretation or writing of the report.

Conflict of Interest Statement

The authors declare no financial interests or connections, direct or indirect, or other situations that might raise the question of bias in the work reported or the conclusions, implications or opinions stated—including pertinent commercial or other sources of funding for the individual author(s) or for the associated department(s) or organization(s), personal relationships or direct academic competition.

References

1. Kannan M, Rajendran R, Sunish IP, Balasubramaniam R *et al.* A study on chikungunya outbreak during 2007 in Kerala, South India. *Indian J Med Res* [Internet] 2009; 129:311–5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19491425>.
2. Staikowsky F, Talarmin F, Grivard P *et al.* Prospective study of Chikungunya virus acute infection in the Island of La Réunion during the 2005–2006 outbreak. *PLoS One* [Internet] 2009; 4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2764049/>.
3. Katti R, Shahapur PR, Udapudi KL. Impact of chikungunya virus infection on oral health status: an observational study. *Indian J Dent Res* [Internet] 2011; 22:613. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22124070>.
4. Kumar R, Sharma MK, Jain SK, Yadav SK, Singhal AK. Cutaneous manifestations of chikungunya fever: observations from an outbreak at a Tertiary Care Hospital in Southeast Rajasthan, India. *Indian Dermatol Online J* [Internet] 2017; 8:336–42. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28979866>.
5. Simarmata D, Ng DCE, Kam Y-W *et al.* Early clearance of Chikungunya virus in children is associated with a strong innate immune response. *Sci Rep* [Internet] 2016; 6. <https://www.nature.com/articles/srep26097>.
6. Riyaz N, Riyaz A, Rahima *et al.* Cutaneous manifestations of chikungunya during a recent epidemic in Calicut, North Kerala, South India. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* [Internet]. 2010;76: 671–6. <http://www.ijdv.com/article.asp?issn=0378-6323;year=2010;volume=76;issue=6;page=671;epage=676;aulast=Riyaz>.
7. Singaraju GS, Vanaja E, Sathe PS. Oral manifestations of Chikungunya fever in clinically diagnosed Chikungunya cases (CDCG)-a purposive study. *Annals Essences Dent* [Internet] 2010; 2:25–9. <https://www.longdom.org/abstract/oral-manifestations-of-chikungunya-fever-in-clinically-diagnosed-chikungunya-cases-cdcga-purposive-study-764.html>.
8. Anderson KB, Pureza V, Walker PF. Chikungunya: acute fever, rash and debilitating arthralgias in a returning traveler from Haiti. *J Travel Med* [Internet]. 2014; 21: 418–20. <https://academic.oup.com/jtm/article/21/6/418/1843067>.
9. Nkoghe D, Kassa RF, Caron M *et al.* Clinical forms of Chikungunya in Gabon, 2010. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet] 2012; 6:e1517. <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001517>.
10. Alvarado LI, Lorenzi OD, Torres-Velásquez BC *et al.* Distinguishing patients with laboratory-confirmed chikungunya from dengue and other acute febrile illnesses, Puerto Rico, 2012–2015. *PLoS Negl Trop Dis*. [Internet] 2019; 13:e0007562. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0007562>.

RESEARCH ARTICLE

A clinical scoring system to predict long-term arthralgia in Chikungunya disease: A cohort study

Laise de Moraes^{1,2}✉, Thiago Cerqueira-Silva^{1,2}✉, Victor Nobrega^{1,2}, Kevan Akrami^{1,3}, Luciane Amorim Santos⁴, Cibele Orge^{1,2}, Paula Casais^{1,2}, Lais Cambui^{1,2}, Rita de Cássia Pontello Rampazzo⁵, Karen Soares Trinta⁵, Camila Amato Montalbano⁶, Maria Jania Teixeira⁷, Luciano Pamplona Cavalcante⁷, Bruno B. Andrade¹, Rivaldo Venâncio da Cunha^{8,9}, Marco Aurélio Krieger^{8,9}, Manoel Barral-Netto^{1,2,10}, Aldina Barral^{1,2,10}, Ricardo Khouri^{1,2,11}‡, Viviane Sampaio Boaventura^{1,2,12}*✉



1 Instituto Gonçalo Moniz (IGM)—Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) Bahia, 2 Faculdade de Medicina da Bahia—Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, Brazil, 3 University of California, San Diego, Division of Infectious Disease, Department of Medicine, San Diego, California, United States of America, 4 Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Curitiba, PR, Brazil, 5 Fundação Oswaldo Cruz, Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 6 Faculdade de Medicina, Universidade do Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS, Brazil, 7 Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, Brazil, 8 Fiocruz, Campo Grande, MS, Brazil, 9 Instituto Carlos Chagas—ICC/Fiocruz, Curitiba-PR, Brazil, 10 Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Investigação em Imunologia, São Paulo-SP, Brazil, 11 Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, Leuven, Belgium, 12 Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital Santa Izaabel/Santa Casa de Misericórdia da Bahia (HIS/SCMBa), Salvador, Brazil

OPEN ACCESS

Citation: de Moraes L, Cerqueira-Silva T, Nobrega V, Akrami K, Santos LA, Orge C, et al. (2020) A clinical scoring system to predict long-term arthralgia in Chikungunya disease: A cohort study. *PLoS Negl Trop Dis* 14(7): e0008467. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008467>

Editor: Anita K. McElroy, CDC, UNITED STATES

Received: November 11, 2019

Accepted: June 9, 2020

Published: July 21, 2020

Copyright: © 2020 de Moraes et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) [Finance Code 001], Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [439967/2016-3], Programa de Excelência em Pesquisa [420765/2017-4] and Financiadora de Estudos e Projetos [MCTIC/FINEP/FNDCT 01/2016 ZIKA - 0416006000]. AB and MB-N are CNPq fellows. The

✉ These authors contributed equally to this work.

‡ RC and VSB also contributed equally to this work.

* viviane.boaventura@bahia.fiocruz.br

Abstract

Background

Chikungunya virus (CHIKV) has caused worldwide epidemics that impose a major burden on health systems. Approximately half of infected individuals develop chronic debilitating arthralgia, affecting their quality of life. Here, we identified the relevant clinical and demographic variables in the acute phase of CHIKV infection prospectively linked to chronic arthralgia to elaborate a prognostic scoring system.

Methods

Acute CHIKV infection cases (n = 134) confirmed by serology or molecular test were examined <10 days of disease onset and followed for one year to evaluate for disease progression. Potential risk factors for chronic arthralgia were evaluated by multivariate analysis to develop a prognostic scoring system, which was subsequently tested in an independent validation cohort consisting of 42 individuals.

Results

A total of 107 out of 134 (80%) acute CHIKV-confirmed cases from the derivation cohort were re-examined one year after enrollment. Chronic arthralgia post-CHIKV infection was

funding organizations had no role in the study design, data collection, data interpretation or writing of this report.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

diagnosed in 64 (60%). Five of the 12 parameters evaluated in the acute phase were statistically associated with persistent arthralgia and were further tested by Bayesian analysis. These variables were weighted to yield a prognosis score denominated SHERA (Sex, Hypertension, Edema, Retroocular pain, Age), which exhibited 81.3% accuracy in predicting long-term arthralgia post-CHIKV infection in the derivation cohort, and 76.5% accuracy in the validation cohort.

Conclusions

The simplified and externally validated prognostic scoring system, SHERA, is a useful method to screen acutely CHIKV-infected patients at elevated risk of chronic arthralgia who will benefit from specific interventions. This tool could guide public health policies, particularly in resource-constrained settings.

Author summary

Debilitating articular pain frequently occurs as a consequence of Chikungunya virus infection, affecting individuals' quality of life for a long time. Here we present a simple tool to predict people at risk to remain with long-term articular pain after Chikungunya infection. We evaluated 134 patients acutely affected by Chikungunya virus searching for characteristics previously described as related to persistent symptoms. We examined about 80% of those individuals after one year to identify those with persistent arthralgia. We detected five features that represent good predictors and developed a scoring system named SHERA (www.sheracalculator.com/shera), the acronyms of Sex (female), Hypertension, Edema, Retroocular pain and Age (>26y). SHERA can correctly predict 8 out of every 10 Chikungunya infected individuals that will persist with articular pain symptoms at least one year after disease onset. These results were confirmed in the second group of patients from another city affected by Chikungunya outbreak.

The easy-to-use scoring system can be applied in areas with limited access to health support, helping to identify the ones who will need special care and benefit from early intervention.

Introduction

Debilitating manifestations are attributed to infection by the arthritogenic chikungunya alphavirus (CHIKV). Until early 2000, sporadic outbreaks of chikungunya had been reported in Africa and South Asia.[1] After 2004, the virus spread to Europe and the Americas, highlighting potential for worldwide CHIKV dissemination.[2,3] In Brazil, several outbreaks have been reported since the first case in 2014, with progressively higher numbers of affected individuals with every successive epidemic.[4]

The acute phase of CHIKV infection, reported to be symptomatic in approximately 90% of infected individuals, is characterized by rapid onset of fever, with intense and polyarticular arthralgia, edema, cutaneous rash, pruritus, headache, nausea, retroocular pain and oral lesions.[5] Notably, up to 87.2% of affected patients have persistently recurrent chronic skeletal muscle symptoms and arthralgia lasting more than three months.[6–8] Chronic manifestations post-CHIKV infection can lead to absenteeism with significant social and economic impacts.[9,10]

As no vaccine or effective treatment is available, chronic symptoms persisting after the acute phase of CHIKV infection require special care.[11] Musculoskeletal deformities have been described, in addition to aggravation of comorbidities, such as hypertension and diabetes.[11–13] Renal failure and gastric complications related to the prolonged use of medications to treat pain, as well as depression, have been reported.[11,14,15]

Early identification of individuals at risk for chronic manifestations subsequent to CHIKV infection may optimize medical care. Prior work suggests that symptoms present during the acute phase relate to chronicity and that persistent arthralgia occurs more frequently in women, individuals over 40 years of age and those with preexisting comorbidities, such as hypertension.[7,16–18] However, no attempt has been made to develop a clinical/sociodemographic scoring system to predict chronicity following acute CHIKV infection.

Herein, we performed periodic evaluations of clinical symptoms up to one year in two cohorts of patients presenting clinically-, molecular- and/or serologically-confirmed CHIKV mono-infection in the acute-phase. We then sought to determine predictors of long-term arthralgia post-CHIKV infection to derive an easy-to-use prognostic scoring system.

Materials & methods

Ethics statement

This study was approved by the Institutional Review Board of the School of Medicine—Federal University of Bahia—Brazil (derivation cohort—approval number: 1.657.324) and by the Institutional Review Board of Bahia State University of Feira de Santana (validation cohort— approval number: 1.450.762).

Study population

A total of 230 individuals were recruited by active case detection in the derivation cohort between 2016 and 2018 in the context of three concomitant outbreaks of arbovirus fever (Zika/dengue/chikungunya). Two sites were selected in the state of Bahia (North: Campo Formoso and South: Itabuna) and one in the state of Ceará (Maranguape) (S1 Fig). The two furthest sites were over 1,000 km distant from each other (S1 Fig).

Our validation cohort was composed of 42 cases who met eligibility criteria from 219 CHIKV cases in Feira de Santana (Bahia State), site of the first outbreak of CHIKV in Brazil in 2014.[19] Patients were recruited at a health care unit and followed for twelve months.

Individuals were considered eligible if they reported feeling feverish, demonstrated fever or presented cutaneous rash in association with at least one of the following manifestations: cutaneous pruritus, arthritis, arthralgia, headache, myalgia or retroocular pain (ROP). In both cohorts, individuals were excluded if: 1. disease onset was longer than 10 days prior to time of recruitment; 2. no sample was collected; 3. they tested negative for CHIKV by qRT-PCR and ELISA; 4. another concomitant arbovirus infection was detected by qRT-PCR or serology in blood, saliva or urine sample.

To identify possible early clinical markers of disease progression, all participants were questioned about the presence and duration of fever, maculopapular cutaneous rash (MPCR), arthralgia, articular edema in the upper and lower extremities, ROP, myalgia, tendon pain and other comorbidities. All patients underwent a clinical examination by one or two physicians to assess acute signs of CHIKV infection such as rash and articular edema in addition to prior comorbidities, such as hypertension, previous arthropathy and chronic peripheral edema. To determine the evolution of arthralgia, these questions and clinical examination were repeated at three and 12 months after onset of clinical symptoms in individuals with confirmed CHIKV mono-infection. Individuals with confirmed CHIKV infection were classified as chronic arthralgia post-CHIKV infection if they reported continuous or weekly episodes of new

musculoskeletal pain or aggravation of prior arthritic pain (in the case of reported comorbidity). All those with chronic arthralgia had one of the following, by history and physical exam: persistent arthritis, tenosynovitis, and edema. Symptomatic treatment of acute and chronic symptoms was performed, focused on pain relief as previously described.[11]

Quantitative Reverse Transcription PCR- qRT-PCR

EDTA-treated plasma, urine and oral swab samples were collected for molecular diagnosis of ZIKV, DENV and CHIKV infection. RNA was extracted from plasma (140 μ L), urine (140 μ L) and saliva (oral swab was incubated in 140 μ L of H₂O nuclease free) samples using a commercial Viral RNA isolation kit (QIAmp Viral RNA mini kit, Qiagen- Germany). Quantitative RT-PCR was performed using two different assays: IBMP KIT BIOMOL ZDC (IBMP-Brazil) or CDC Trioplex assay (CDC, USA) for ZIKV, CHIKV, DENV and RNase P. All assays were performed in accordance with manufacturer's instructions.

Serological testing

Heparin-treated plasma samples were collected for serological diagnosis of ZIKV, DENV and CHIKV infection. ELISA assays (Euroimmun, Germany) for detection of IgM antibodies against ZIKV, DENV and CHIKV were performed according to manufacturer's instructions.

A confirmed case was defined as a positive test for one of the laboratory criteria: a positive qRT-PCR in serum, saliva or urine, or detection of specific IgM antibody.

Statistical analysis

Kolmogorov-Smirnov normality test determined the choice of parametric or non-parametric testing using the Chi-squared test, Fisher's exact test, One-way ANOVA, the Kruskal-Wallis test. Receiver-operator (ROC) curve analysis was used to discretize continuous variables. To evaluate evolution of arthralgia, Kaplan-Meier survival curves and log-rank testing were employed. All statistical tests were two-tailed with a significance level of 5%.

All variables significant by univariate analysis were applied in compatible classifier algorithms using the following linear and non-linear approaches: Neural Network, C5.0 algorithms, Classification and Regression Tree (CART), Bayesian Network, Logistic Regression, Quick Unbiased Efficient Statistical Tree (QUEST) and Chi-squared Automatic Interaction Detection (CHAID). Each variable's coefficient by multivariate analysis was used to build a predictive clinical scoring model. The performance parameters were calculated using the results predicted by clinical scoring system following formulas:

$$\text{Sensitivity} = \frac{\text{True Positive (TP)}}{\text{TP} + \text{False Negative (FN)}}; \text{Specificity} = \frac{\text{True Negative (TN)}}{\text{False Positive (FP)} + \text{TN}};$$

$$\text{Positive Predictive Value} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FP}}; \text{Negative Predictive Value} = \frac{\text{TN}}{\text{TN} + \text{FN}}; \text{Accuracy} = \frac{\text{TP} + \text{TN}}{\text{TP} + \text{TN} + \text{FP} + \text{FN}}.$$

The confidence intervals for sensitivity, specificity, predictive values, and accuracy were calculated using the Clopper-Pearson method.

Data were analyzed using IBM SPSS version 25 (Armonk, NY: IBM Corp.), IBM SPSS Modeler 18.2 (Armonk, NY: IBM Corp.) and GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Software, USA).

Results

Description of derivation cohort

Among the 230 individuals initially screened, 96 patients were excluded for reasons listed in Fig 1, yielding 134 exclusively infected with acute CHIKV (Fig 1). Of these, 60.1% of CHIKV

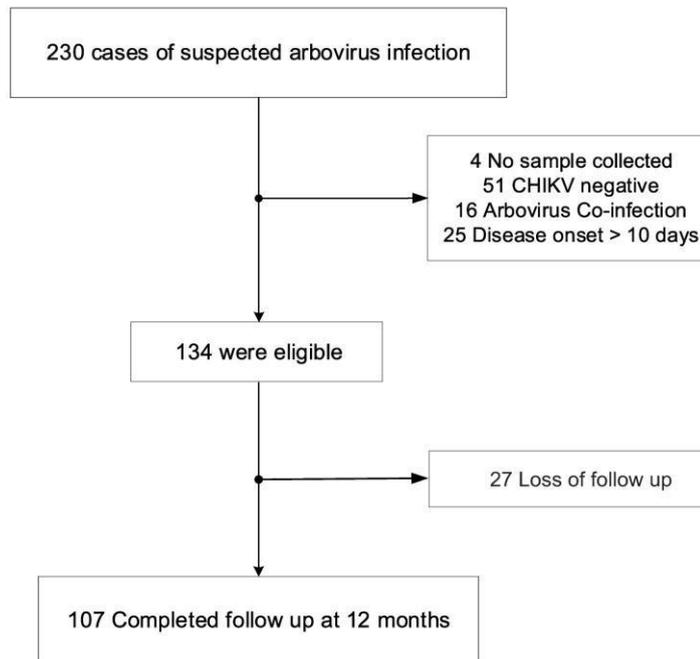


Fig 1. Flow chart of derivation cohort detailing exclusion criteria and number of cases excluded at each step. Follow-up conducted at 12 months after onset of CHIKV symptoms.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008467.g001>

cases tested positive by qRT-PCR, 57.1% by serology and 17.3% by both methods (Fig 2A). A total of 16 cases were excluded due to ZIKV ($n = 11$) and DENV ($n = 5$) co-infection (Fig 2B). Most prevalent symptoms included arthralgia in all patients, followed by fever, headache, myalgia, edema, vomiting, ROP, MPCR, pruritus and hypertension. Of note, similar demographic data and clinical symptoms were observed at all recruitment sites (Table 1). A total of 107 patients were reevaluated after 12 months as 27 patients (20%) were unavailable for follow up. Persistent arthralgia was detected in 64 (60%) individuals (Table 1).

Clinical symptoms associated with persistent arthralgia after 12 months of follow-up

Of 12 demographic and clinical parameters investigated, edema ($p < 0.0001$), pruritus ($p = 0.0178$), hypertension ($p = 0.0065$), ROP ($p = 0.0036$), sex ($p = 0.0014$) and age (dichotomized at 26 years, $p < 0.0001$) were statistically associated with persistent arthralgia at 12 months (Table 2). Age was dichotomized using area under curve (AUC) = 0.692 and Youden Index = 0.392 (S2A and S2B Fig). Among these statistically significant observations, edema demonstrated the highest odds ratio (OR = 13.46; CI = 4.827–32.91, $p < 0.0001$), highlighting its importance in development of chronic arthralgia after confirmed acute CHIKV infection

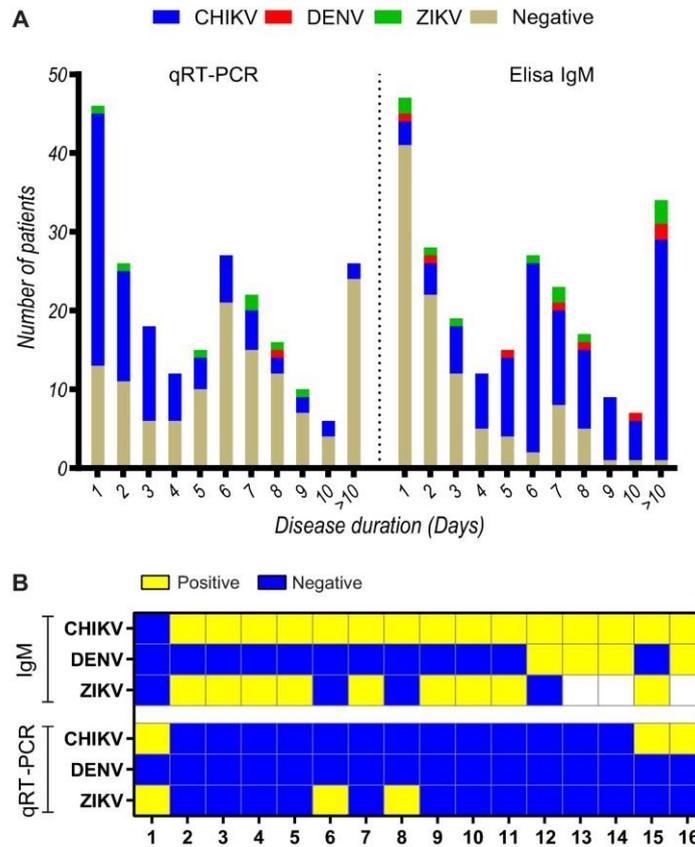


Fig 2. (A) Diagnostic results of arbovirus infection (chikungunya, dengue and Zika virus) performed in the study population (all 230 suspected cases). Molecular diagnosis was performed by qRT-PCR in EDTA-plasma, urine and saliva samples and serological diagnosis was based on detection of IgM by ELISA in Heparin-plasma samples. Positive CHIKV cases were represented in blue, DENV in red and ZIKV in green. Cases tested negative for all three arbovirus were represented in brown. (B) Heat map showing diagnostic results of the patients excluded due to arbovirus co-infection. Positive test (yellow), negative (blue) and not tested (white).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008467.g002>

(Table 2). A heat map graph was generated to summarize the impact of age, hypertension and other clinical signs and symptoms found to be significantly associated with chronic arthralgia (Fig 3).

A Kaplan-Meier analysis of frequency of recovery reveals that from 42 patients that were recovered at day 360, 21 (50%) were asymptomatic at day 14 (Fig 4).

Clinical predictors of persistent arthralgia after 12 months of follow-up

To better understand the independent values of each variable in classification of possible cases of chronic arthralgia, multivariate analysis was performed in the derivation cohort,

Table 1. Baseline characteristics of patients comprising derivation cohort according to study site.

Observations	Campo Formoso (n = 76)	Itabuna (n = 24)	Maranguape (n = 34)	χ^2 or Kruskal Wallis	Total (n = 134)
State	Bahia	Bahia	Ceará		
Year of recruitment	2016	2016	2017		
Disease duration (days)	5 (2–7)	2 (1–3)	5 (2–8)	0.001	4 (2–6)
Patient characteristic					
Age (years)	42.0 (28–54.0) [†]	33.0 (23.0–43.0) [†]	43.5 (25.3–63.3)	0.419	39.0 (26.5–55) [□]
Sex (Female)	64.5% (49)	41.7% (10)	61.8% (21)	0.134	59.7% (80)
Fever	96.1% (73)	100% (24)	94.1% (32)	0.331	96.3% (129)
Myalgia	89.5% (68)	83.3% (20)	85.3% (29)	0.679	87.3% (117)
Arthralgia	100% (75)	100% (24)	100% (34)	1	100% (133)
Edema	69.7% (53)	54.2% (13)	76.5% (26)	0.188	68.7% (92)
MPCR	53.9% (41)	50% (12)	73.5% (25)	0.105	58.2% (78)
Pruritus	53.9% (41)	41.7% (10)	55.9% (19)	0.510	52.2% (70)
Headache	89.5% (68)	95.8% (23)	79.4% (27)	0.139	88.0% (118)
ROP	65.8% (50)	70.8% (17)	50.00% (17)	0.189	62.7% (84)
Vomits/Nausea	66.7% (50) [*]	62.5% (15)	76.5% (26)	0.469	68.4% (91)
Hypertension	21.1% (16) [§]	8.3% (2)	20.6% (7)	0.302	18.7% (25) [□]
Arthralgia persistence at 12 months	70.0% (42/60)	38.9% (7/19)	57.1% (16/28)	0.112	60.7% (65/107)

*n = 75

†n = 23.

□n = 132

§n = 74

MPCR = Maculopapular Cutaneous Rash

ROP = Retro-orbital pain

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008467.t001>

considering all variables with $p < 0.05$ (Fisher's exact test) and multinomial logistic models were built adding variables sequentially. The quality of each model was assessed by Akaike information criterion (AIC). Accordingly, pruritus was excluded as addition of this variable in the model worsened its performance.

Table 2. Performance measures of significant variables in the derivation cohort.

Observations	Sensitivity (CI)	Specificity (CI)	Positive Predictive Value (CI)	Negative Predictive Value (CI)	Likelihood Ratio	Odds Ratio	Fisher's exact test
Edema	89.23% (79.40% to 94.68%)	61.90% (46.81% to 75.00%)	78.38% (67.73% to 86.23%)	78.79% (62.25% to 89.32%)	2.34	13.46 (4.827 to 32.91)	<0.0001
Age > 26 years old	89.23% (79.40% to 94.68%)	50.00% (33.36% to 62.28%)	73.42% (62.76% to 81.91%)	75.00% (56.64% to 87.32%)	1.79	8.286 (2.990 to 20.44)	<0.0001
ROP	73.85% (62.05% to 82.98%)	54.76% (39.95% to 68.78%)	71.64% (59.91% to 81.03%)	57.50% (42.40% to 71.49%)	1.63	3.418 (1.461 to 7.844)	0.0041
Sex (Female)	72.31% (60.42% to 81.71%)	52.38% (37.72% to 66.64%)	70.15% (58.34% to 79.77%)	55.00% (39.83% to 69.29%)	1.54	2.872 (1.239 to 6.427)	0.0139
Hypertension	29.23% (19.58% to 41.20%)	92.86% (80.99% to 97.54%)	86.36% (66.67% to 95.25%)	45.88% (35.70% to 56.42%)	4.09	5.370 (1.510 to 17.97)	0.0065
Pruritus	60.00% (47.86% to 71.03%)	64.29% (49.17% to 77.01%)	72.22% (59.11% to 82.38%)	50.94% (37.88% to 63.88%)	1.68	2.700 (1.205 to 6.001)	0.0178

ROP = Retro-Orbital Pain

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008467.t002>

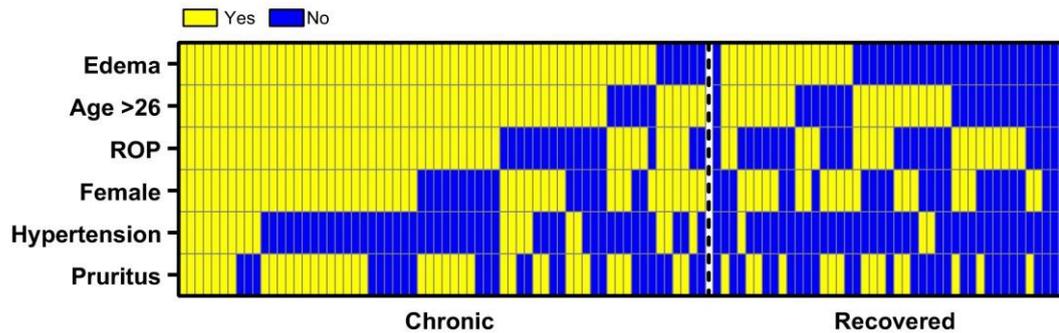
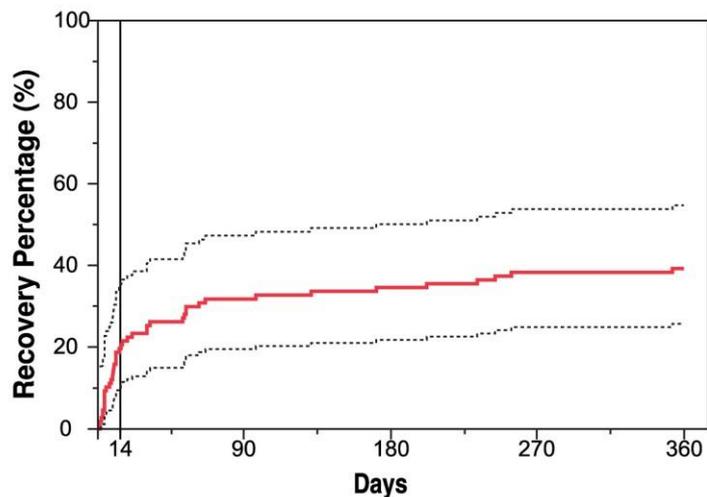


Fig 3. Heat map showing the presence (yellow) or absence (blue) of clinical and social demographic characteristics in individuals with chronic (n = 65) or recovered (n = 42) arthralgia. Data were collected in the first 10 days of disease onset.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008467.g003>

The remaining variables were subsequently used in all compatible classifier algorithms. The top three models based on AUC and accuracy were the Bayesian Network, Logistic Regression and Classification and Regression Tree (CART). All three models showed similar results (S3



Days	Number at risk					
	0	14	90	180	270	360
Cases	107	86	74	71	67	65

Fig 4. Recovery percentage of CHIKV-infected patients over the time. Recovery percentage was analyzed by Kaplan-Meier survival curve (solid line) and 95% confidence intervals (dashed line). The numbers at risk represent the number of cases with arthralgia at each time point.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008467.g004>

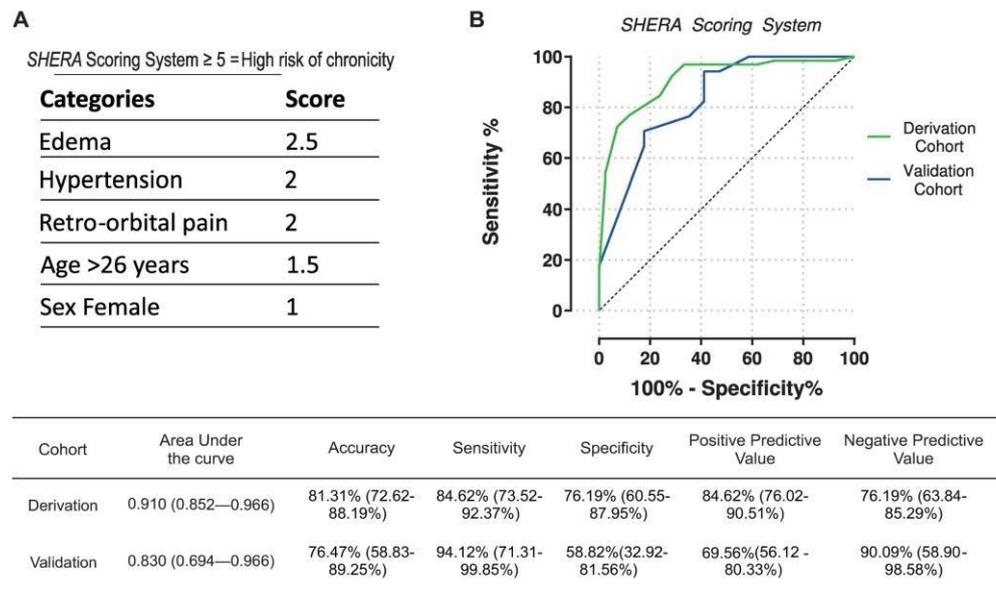


Fig 5. (A) SHERA Scoring System categories and score. (B) Performance measures of SHERA Scoring System (with the 95% confidence interval values in parentheses) in derivation and validation cohorts.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008467.g005>

Fig). The Bayesian Network model presented the best overall accuracy (83.02%, AUC = 0.921; S3 Fig).

The variable coefficients calculated by the Bayesian Network model were multiplied by 10 and used to build the predictive clinical scoring model. The nearest integer value was used to assign a weight to each independent predictor. The resulting values were Edema = 2.5 points, ROP = 2, Hypertension = 2, Age >26 = 1.5, Female = 1 (Fig 5A). This five-factor prognostic clinical scoring scale, named SHERA score (Sex, Hypertension, Edema, Retroocular pain, Age), presented an AUC of 0.909 (95%CI 0.852–0.966) and was split into two risk categories (i.e., low and high risk of chronicity) according to the best accuracy indicated by Youden Index. The best cutoff point was found to be ≥ 5 points, indicating a high risk of chronicity, while a score < 5 indicated low risk. We also built an online tool to calculate the SHERA score value at www.sheracalculator.com/shera. The resulting performance measures in the derivation cohort were 81.31% (95%CI 72.62–88.19) accuracy, 84.62% (73.52–92.37) sensitivity, 76.19% (60.55–87.95) specificity, 84.62% positive predictive value and 76.19% negative predictive value (Fig 5B).

Validation Cohort

The same diagnostic criteria used in the derivation cohort were applied to select 42 patients included in the validation cohort. Baseline characteristics were similar to the derivation cohort, as demonstrated in Table 3. Within the first 10 days of disease onset, fever, myalgia and headache were more frequently reported, followed by MPCR, edema, pruritus, ROP, vomiting and

Table 3. Comparison of baseline characteristics of patients from both cohorts.

Observations	Derivation Cohort (n = 134)	Validation Cohort (n = 42)	χ^2 or Kruskal Wallis
Year of recruitment	2016–2017	2015	
Disease duration (days)	4 (2–6)	4 (2–6)	0.577
Patient characteristics			
Age (years)	38.0 (26–55)*	39.0 (28.5–47)	0.778
Sex (Female)	59.7% (80)	61.9% (26)	0.799
Fever	96.3% (129)	92.9% (39)	0.355
Myalgia	87.3% (117)	92.9% (39)	0.319
Arthralgia	100% (134)	100% (42)	1
Edema	68.7% (92)	81.0% (34)	0.124
MPCR	58.2% (78)	81.0% (34)	0.0075
Pruritus	52.2% (70)	61.9% (26)	0.272
Headache	88.0% (118)	81.0% (34)	0.250
ROP	62.7% (84)	64.3% (27)	0.851
Vomits/Nausea	68.4% (91)	54.8% (23)	0.107
Hypertension	18.7% (25) *	16.7%(7)	0.770
Arthralgia persistence	60.7% (65/107) ⁶	50.0%(17/34) *	0.272

*n = 132

MPCR = Maculopapular cutaneous rash

ROP = Retro-Orbital Pain

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008467.t003>

hypertension. Eight out of the 42 (19.05%) were lost to follow up, yielding 34 patients reevaluated after 12 months. Persistent arthralgia was identified in 17 patients (50.00%) (Table 3 and S4 Fig).

The application of the SHERA scoring model to predict persistence of arthralgia in the validation cohort resulted in an overall accuracy of 76.47% (58.83–89.25%) ([0.830 AUC (0.694–0.966)], with 94.12(71.31–99.85)% sensitivity, 58.82(32.92–81.56)% specificity, 69.57% positive predictive value and 90.91% negative predictive value (Fig 5B).

Discussion

The present study derived a simplified clinical scoring system shown to accurately predict chronic arthralgia post-CHIKV infection in a Brazilian cohort of 107 individuals, and further validated externally in an independent cohort of 42 patients. Only individuals with CHIKV mono-infection were included in the study as other arbovirus infections were excluded by antibody and molecular testing of serum, saliva and urine samples. Furthermore, only acute cases with initial evaluation conducted within 10 days of disease onset were included to minimize recall bias.

The components of the SHERA scoring system have not been previously combined to compose a prognosis system. It is important to note that all clinical and demographic markers identified in the derivation cohort, used to compose the SHERA scoring system, had been previously linked to persistent symptoms as a consequence of CHIKV infection.[7,16,20–24] Age was the most frequently mentioned predictor of persistent arthralgia, with a range of 20–60 years presenting increased risk of developing chronic arthralgia post-CHIKV infection. [7,16,17,21,22] This reported variability in age range may be related to demographic differences among patients recruited, as well as study design. Increased risk in older populations has been reported in studies based on telephone or e-mail interviews, excluding individuals younger than 18 years.[7,17] This strategy may have missed younger patients, thereby increasing

the median age of the observed population. In our cohorts, active recruitment and clinical evaluation by a physician at all time-points ensured accurate representation of all age groups. Almost 25% of the patients recruited herein were under 26 years of age, and only 25% presented with symptoms one year after disease onset, compared to 73.42% of individuals older than 26 years. Similarly, a prior study demonstrated chronicity in 17% of individuals aged < 25 years and increased risk of chronicity in those over 25 years of age.[24]

A higher proportion of women (72,31%) was found in the group with chronic arthralgia post-CHIKV infection compared to those who recovered after acute disease (47,62%). Concordantly, previous studies have reported an increased risk of long-term arthralgia in women. [20,22,25]

Edema, hypertension and ROP were also related to the persistence of chronic arthralgia post-CHIKV infection. Development of edema at early stages of infection may be a hallmark of an intense anti-CHIKV immune response or proliferative viral activity in the joints that ultimately results in chronic tissue damage and arthritis.[26] However, prior arthropathy or peripheral vascular disease should be investigated to exclude any other possible causes of edema, especially in the lower extremities. Furthermore, hypertensive individuals were also more likely to persist with arthralgia, as previously reported.⁷ This condition also seems to be associated with more severe outcomes and increased mortality in the acute phase of CHIKV infection.[27,28] Together, these data suggest the possible synergistic action of an arthritogenic virus with other inflammatory conditions that compound clinical manifestations. While we speculate that both edema and ROP in individuals who develop persistent arthralgia post-CHIKV infection may be indicative of exacerbated systemic inflammation during the acute phase, comprehensive investigation of such a mechanism has yet to be performed.

Among the group of patients who recovered and did not develop chronic arthralgia post-CHIKV infection, approximately 60% reported being asymptomatic within a month of initial symptoms. This may be linked to rapid viral clearance due to effective early mechanisms of immune defense that seem to influence clinical recovery.[29]

While our study has multiple strengths, a potential limitation may be that both derivation and validation cohorts are from the same region and with relatively small sample size. While they were recruited during outbreaks from different years, with a rigorous inclusion criteria, it is possible that there is genetic variability of patients and differences in CHIKV genotypes that could affect the accuracy of the proposed score. Although the variables used as part of the parsimonious score have been individually published worldwide previously, the robustness of the SHERA score in patients requires additional evaluation with a larger sample size in distinct geographic areas at risk for CHIKV infection. Additionally, specificity seemed to be the weakest parameter of SHERA Scoring System specially in the validation cohort, suggesting this prognosis tool may be used primarily for screening and it may be improved by adding novel biomarkers.

While no specific treatment is available for CHIKV, the identification of a precise tool that predicts those at risk for chronicity could significantly impact patient care. Individuals at risk for chronicity would benefit from a multidisciplinary therapeutic approach and careful monitoring of comorbidities potentially aggravated by CHIKV infection. Given that CHIKV has an elevated attack rate and high predilection for chronicity, the SHERA score could aid in predicting the frequency and distribution of chronic cases, effectively targeting public health services in at risk areas and mitigating the socioeconomic impact of arthralgia post-CHIKV infection.

This study highlights the reliability of a novel validated easy-to-use clinical score for risk of chronicity in CHIKV infection. As a simple and inexpensive tool that uses clinical information, this prognostic scoring system may be effective in limited resource settings and aid in guiding public health policies to alleviate the social economic impacts of CHIKV infection.

Supporting information

S1 Fig. Study areas for the derivation (Campo Formoso, Itabuna and Maranguape) and validation (Feira de Santana) cohorts.
(TIF)

S2 Fig. A) Performance of age to predict arthralgia after one year using Area Under the Curve analysis. B) Relative values of chronic arthralgia with respect to age groups.
(TIF)

S3 Fig. Performance of multivariate models designed to predict chronic arthralgia post-chikungunya infection in the derivation (A) and in the validation (B) cohorts.
(TIF)

S4 Fig. Flow chart of validation cohort showing exclusion criteria and number of cases excluded at each step. Follow-up conducted 12 months after onset of CHIKV symptoms.
(TIF)

Acknowledgments

The authors are grateful to Nara Rubia Santos, Gilmar Carlos dos Santos and Valderi Ferreira de Andrade Neto for technical support in the cities of Campo Formoso, Itabuna and Maranguape. We wish to acknowledge the Municipal Health Secretariats of Campo Formoso, Senhor do Bonfim, Itabuna and Maranguape, and the São Francisco Hospital in Campo Formoso for logistical support. The authors would also like to thank Andris K. Walter for English language revision and manuscript copyediting assistance.

Author Contributions

Conceptualization: Manoel Barral-Netto, Aldina Barral, Ricardo Khouri, Viviane Sampaio Boaventura.

Data curation: Ricardo Khouri.

Formal analysis: Laise de Moraes, Thiago Cerqueira-Silva, Luciane Amorim Santos, Cibele Orge, Lais Cambui, Karen Soares Trinta, Camila Amato Montalbano.

Funding acquisition: Manoel Barral-Netto, Aldina Barral.

Investigation: Victor Nobrega, Kevan Akrami, Paula Casais, Rivaldo Venâncio da Cunha, Viviane Sampaio Boaventura.

Resources: Maria Jania Teixeira.

Supervision: Viviane Sampaio Boaventura.

Writing – original draft: Thiago Cerqueira-Silva, Ricardo Khouri, Viviane Sampaio Boaventura.

Writing – review & editing: Rita de Cássia Pontello Rampazzo, Luciano Pamplona Cavalcante, Bruno B. Andrade, Marco Aurélio Krieger, Manoel Barral-Netto, Aldina Barral.

References

1. Wahid B, Ali A, Rafique S, Idrees M. Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. *Int J Infect Dis.* 2017; 58: 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.03.006> PMID: 28268924

2. Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli A, Panning M, et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet*. 2007; 370: 1840–1846. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61779-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61779-6) PMID: 18061059
3. Charrel RN, de Lamballerie X, Raoult D. Chikungunya Outbreaks—The Globalization of Vectorborne Diseases. *N Engl J Med*. 2007; 356: 769–771. <https://doi.org/10.1056/NEJMp078013> PMID: 17314335
4. Charlys da Costa A, Thézé J, Komninakis SCV, Sanz-Duro RL, Felinto MRL, Moura LCC, et al. Spread of Chikungunya Virus East/Central/South African Genotype in Northeast Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23: 1742–1744. <https://doi.org/10.3201/eid2310.170307> PMID: 28930031
5. Cunha RV da Trinta KS. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment—A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017; 112: 523–531. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170044> PMID: 28767976
6. CHOPRA A, ANURADHA V, GHORPADE R, SALUJA M. Acute Chikungunya and persistent musculo-skeletal pain following the 2006 Indian epidemic: a 2-year prospective rural community study. *Epidemiol Infect*. 2012; 140: 842–850. <https://doi.org/10.1017/S0950268811001300> PMID: 21767452
7. Sissoko D, Malvy D, Ezzedine K, Renault P, Moschetti F, Ledrans M, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000389> PMID: 19274071
8. Borgherini G, Poubeau P, Jossaume A, Goux A, Cotte L, Michault A, et al. Persistent Arthralgia Associated with Chikungunya Virus: A Study of 88 Adult Patients on Reunion Island. *Clin Infect Dis*. 2008; 47: 469–475. <https://doi.org/10.1086/590003> PMID: 18611153
9. Cardona-Ospina JA, Villamil-Gómez WE, Jimenez-Canizales CE, Castañeda-Hernández DM, Rodríguez-Morales AJ. Estimating the burden of disease and the economic cost attributable to chikungunya, Colombia, 2014. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2015; 109: 793–802. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trv094> PMID: 26626342
10. Krishnamoorthy K, Harichandrakumar KT, Krishna Kumari A, Das LK. Burden of chikungunya in India: estimates of disability adjusted life years (DALY) lost in 2006 epidemic. *J Vector Borne Dis*. 2009; 46: 26–35. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19326705> PMID: 19326705
11. Simon F, Javelle E, Cabie A, Bouquillard E, Troisgros O, Gentile G, et al. French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). November 2014. *Médecine Mal Infect*. 2015; 45: 243–263. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2015.05.007> PMID: 26119684
12. Who, Searo. Guidelines on Clinical Management of Chikungunya Fever. 2008. Available: http://www.wpro.who.int/mvp/topics/ntd/Clinical_Mgmt_Chikungunya_WHO_SEARO.pdf
13. Cavalcanti LP de G, D'angelo SM, Lemos DRQ, Barreto FK de A, Siqueira AM, Miyajima F. Is the recent increment in attributable deaths to type-2 diabetes (T2D) associated with the latest chikungunya outbreak in a major epidemic area in Brazil? *Rev Soc Bras Med Trop*. 2018; 51: 63–65. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0440-2017> PMID: 29513844
14. Gambaro G, Perazella MA. Adverse renal effects of anti-inflammatory agents: evaluation of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors. *J Intern Med*. 2003; 253: 643–52. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12755960> <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2003.01146.x> PMID: 12755960
15. Elsinga J, Grobusch MP, Tami A, Gerstenbluth I, Bailey A. Health-related impact on quality of life and coping strategies for chikungunya: A qualitative study in Curaçao. McCullough HE, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11: e0005987. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005987> PMID: 28991920
16. Schilte C, Staikovskiy F, Couderc T, Madec Y, Carpentier F, Kassab S, et al. Chikungunya Virus-associated Long-term Arthralgia: A 36-month Prospective Longitudinal Study. Singh SK, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7: e2137. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002137> PMID: 23556021
17. Gérardin P, Fianu A, Michault A, Mussard C, Boussaïd K, Rollot O, et al. Predictors of Chikungunya rheumatism: a prognostic survey ancillary to the TELECHIK cohort study. *Arthritis Res Ther*. 2013; 15: R9. <https://doi.org/10.1186/ar4137> PMID: 23302155
18. Jain J, Nayak K, Tanwar N, Gaind R, Gupta B, Shastri JS, et al. Clinical, Serological, and Virological Analysis of 572 Chikungunya Patients From 2010 to 2013 in India. *Clin Infect Dis*. 2017; 65: 133–140. <https://doi.org/10.1093/cid/cix283> PMID: 28379375
19. Rodrigues Faria N, Lourenço J, Marques de Cerqueira E, Maia de Lima M, Pybus O, Carlos Junior Alcantara L. Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014–2015. *PLoS Curr*. 2016; 8. <https://doi.org/10.1371/currents.outbreaks.c97507e3e48efb946401755d468c28b2> PMID: 27330849
20. Moro ML, Grilli E, Corvetta A, Silvi G, Angelini R, Mascella F, et al. Long-term chikungunya infection clinical manifestations after an outbreak in Italy: A prognostic cohort study. *J Infect*. 2012; 65: 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.04.005> PMID: 22522292

21. Couturier E, Guillemin F, Mura M, Leon L, Virion J-M, Letort M-J, et al. Impaired quality of life after chikungunya virus infection: a 2-year follow-up study. *Rheumatology*. 2012; 51: 1315–1322. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes015> PMID: 22427407
22. Essackjee K, Goorah S, Ramchurn SK, Cheeneebash J, Walker-Bone K. Prevalence of and risk factors for chronic arthralgia and rheumatoid-like polyarthritis more than 2 years after infection with chikungunya virus. *Postgrad Med J*. 2013; 89: 440–447. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2012-131477> PMID: 23645664
23. Yaseen HM, Simon F, Deparis X, Marimoutou C. Identification of initial severity determinants to predict arthritis after chikungunya infection in a cohort of French gendarmes. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014; 15: 249. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-15-249> PMID: 25059583
24. Heath CJ, Lowther J, Noël TP, Mark-George I, Boothroyd DB, Mitchell G, et al. The Identification of Risk Factors for Chronic Chikungunya Arthralgia in Grenada, West Indies: A Cross-Sectional Cohort Study. *Open forum Infect Dis*. 2018; 5: ofx234. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx234> PMID: 29308412
25. Rahim AA, Thekkekara RJ, Bina T, Paul BJ. Disability with persistent pain following an epidemic of chikungunya in rural south India. *J Rheumatol*. 2016; 43: 440–444. <https://doi.org/10.3899/jrheum.141609> PMID: 26669921
26. Teo TH, Chan YH, Lee WWL, Lum FM, Amrun SN, Her Z, et al. Fingolimod treatment abrogates chikungunya virus-induced arthralgia. *Sci Transl Med*. 2017; 9: eaal1333. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal1333> PMID: 28146638
27. Economopoulou A, Dominguez M, Helynck B, Sissoko D, Wichmann O, Quenel P, et al. Atypical Chikungunya virus infections: Clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005–2006 outbreak on Réunion. *Epidemiol Infect*. 2009; 137: 534–541. <https://doi.org/10.1017/S0950268808001167> PMID: 18694529
28. Silva Junior GB da, Pinto JR, Mota RMS, Pires Neto R da J, Daher EDF. Risk factors for death among patients with Chikungunya virus infection during the outbreak in northeast Brazil, 2016–2017. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2019; 113: 221–226. <https://doi.org/10.1093/trstmh/try127> PMID: 30551206
29. Simarmata D, Ng DCE, Kam Y-W, Lee B, Sum MSH, Her Z, et al. Early clearance of Chikungunya virus in children is associated with a strong innate immune response. *Sci Rep*. 2016; 6: 26097. <https://doi.org/10.1038/srep26097> PMID: 27180811