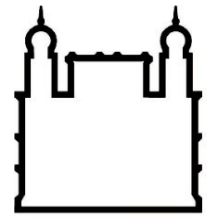




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental

TESE DE DOUTORADO

**ASPECTOS IMUNOLÓGICOS, CLÍNICOS E VIRAIS ASSOCIADOS À
IMUNOPATOGÊNESE DA ARTRALGIA PERSISTENTE APÓS INFECÇÃO PELO
VÍRUS CHIKUNGUNYA**

LEILE CAMILA JACOB NASCIMENTO

Salvador - BA

2024

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental

**ASPECTOS IMUNOLÓGICOS, CLÍNICOS E VIRAIS ASSOCIADOS À
IMUNOPATOGENESE DA ARTRALGIA CRÔNICA APÓS INFECÇÃO PELO
VÍRUS CHIKUNGUNYA**

LEILE CAMILA JACOB NASCIMENTO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Patologia Humana como pré-requisito para obtenção
do título de Doutora

Orientador: Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme de Sousa Ribeiro

Salvador – Bahia

2024

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

N244a Nascimento, Leile Camila Jacob

Aspectos imunológicos, clínicos e virais associados à
imunopatogênese da artralgia crônica após infecção pelo vírus
Chikungunya. / Leile Camila Jacob Nascimento. _ Salvador, 2024.

103 f.: il.: 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme de Sousa Ribeiro

Tese (Doutorado em Patologia Humana e Experimental) –
Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto
Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2024.

1. Chikungunya. 2. Artralgia crônica. 3. Biomarcadores. 4. Carga
viral. I. Título.

CDU 616.91

**"ASPECTOS IMONOLÓGICOS, CLÍNICOS E VIRAIS ASSOCIADOS À IMUNOPATOGÊNESE DA
ARTRALGIA PERSISTENTE APÓS INFECÇÃO PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA".**

Leile Camila Jacob Nascimento

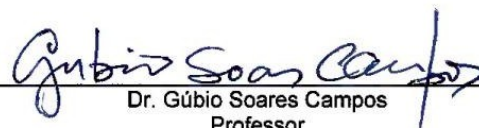
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 13 de dezembro de 2024.

COMISSÃO EXAMINADORA



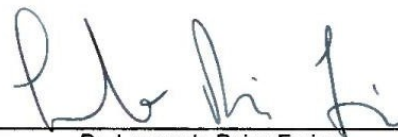
Dra. Maria da Glória Lima Cruz Teixeira
Professora
UFBA



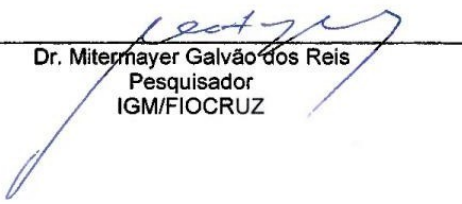
Dr. Gúbio Soares Campos
Professor
UFBA



Dra. Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ



Dr. Leonardo Paiva Farias
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001”

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

Rede de Pesquisa Clínica e Aplicada em Chikungunya (REPLICK).

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores pelo valioso apoio e orientação.

Agradeço especialmente à toda minha família e amigos por todo suporte e incentivo constante durante todos estes anos.

Agradeço também aos colegas e amigos de longa data do Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística e Laboratório de Patologia e Biologia Molecular - FIOCRUZ -BA.

À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Patologia Humana e Experimental.

Ao Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina- UFBA.

A todos que de alguma maneira torceram por mim, que sempre acreditaram no meu esforço e no meu trabalho.

“Enquanto a pobreza, a injustiça e a desigualdade social
persistirem em nosso mundo, nenhum de nós poderá
verdadeiramente descansar.”

(Nelson Mandela)

NASCIMENTO, Leile Camila Jacob. **Aspectos imunológicos, clínicos e viral associados à imunopatogênese da artralgia persistente após infecção pelo vírus Chikungunya**. 2024. 103f. Tese (Doutorado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2024.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Desde sua reemergência em 2013, o vírus chikungunya (CHIKV) causou diversos surtos ao redor do mundo, afetando principalmente a América Latina e o Brasil. Os sintomas que mais frequentemente acometem os indivíduos infectados são: febre, artralgia intensa, edema articular, mialgia e dor de cabeça. A artralgia pode persistir por meses ou até anos após o início dos sintomas e, embora já tenham sido descritos alguns fatores de risco, os mecanismos e a imunopatogênese da artralgia persistente após a infecção pelo CHIKV permanecem desconhecidos. **OBJETIVO:** Investigar fatores de risco clínicos, biomarcadores imunológicos e virais para desenvolvimento da artralgia crônica após a infecção pelo CHIKV durante o curso da doença. **MATERIAL E MÉTODOS:** Avaliação de 71 pacientes com diagnóstico positivo de Chikungunya por RT-qPCR, seguidos em uma coorte para obtenção de informação sobre desfecho de cronificação da artralgia ou resolução dos sintomas e coleta de amostras biológicas. Para todos os pacientes selecionados foram avaliadas características clínicas e sociodemográficas em visitas realizadas 0-7 e 10-45 dias após o início dos sintomas (DPS), respectivamente, e para um subgrupo (n=25), foi realizado pelo menos um atendimento adicional com coleta de amostras >45 dias de início dos sintomas. Nas amostras destes pacientes foram ainda avaliados: IgM e IgG anti-CHIKV, dosagem de 19 citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento além de dosagem de carga viral de CHIKV e sequenciamento de genoma completo. **RESULTADOS:** A maioria dos pacientes estudados era do sexo feminino, representando 67% (48/71) do total, com uma mediana de idade de 40 anos. Entre eles, 59% (42/71) desenvolveram artralgia crônica (>90 dias após o início dos sintomas). Esses indivíduos apresentaram maior frequência de edema e eram, em média, mais velhos durante a fase inicial da doença (0-7 DPS), em comparação ao grupo que não desenvolveu artralgia crônica. Nas amostras pareadas, observou-se soroconversão de anticorpos IgM e IgG em 96% (70/71) e 100% (71/71) dos pacientes, respectivamente. Aproximadamente 30% dos pacientes que desenvolveram artralgia crônica mantiveram níveis detectáveis de anticorpos IgM por mais de dois anos após o início dos sintomas. Além disso, níveis mais elevados de GM-CSF e IP-10/CXCL10 foram observados nas amostras coletadas entre 0-7 e 10-45 DPS, respectivamente, no grupo que evoluiu para artralgia crônica. Por outro lado, a carga viral não demonstrou associação com o desenvolvimento de artralgia crônica, e as mutações encontradas nos genomas virais não apresentaram relevância clínica significativa. **CONCLUSÕES:** Presença de edema e idade elevada foram identificados neste estudo como fatores associados ao desenvolvimento de artralgia crônica. Observou-se que o uso de opioides na fase inicial da doença foi mais comum em pacientes que evoluíram para esse quadro, sugerindo a presença de sintomas mais intensos e a necessidade de um manejo específico da dor. Características intrínsecas do indivíduo e resposta imune parecem desempenhar um papel mais importante do que as do vírus na evolução para artralgia crônica.

Palavras-chave: Chikungunya. Artralgia crônica. Biomarcadores. Carga viral.

NASCIMENTO, Leile Camila Jacob. **Immunological, clinical and virus-related aspects associated with the immunopathogenesis of chronic arthralgia post chikungunya virus infection**. 2024. 103f. Tese (Doutorado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2024.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Since its re-emergence in 2013, the chikungunya virus (CHIKV) has caused numerous outbreaks worldwide, particularly affecting Latin America and Brazil. The most common symptoms among infected individuals include fever, severe arthralgia, joint swelling, myalgia, and headache. Arthralgia may persist for months or even years after symptom onset, and although some risk factors have been described, the mechanisms and immunopathogenesis underlying persistent arthralgia following CHIKV infection remain unknown. **OBJECTIVE:** To investigate clinical risk factors, immunological and viral biomarkers associated with the development of chronic arthralgia following CHIKV infection during the disease course. **MATERIALS AND METHODS:** This study evaluated 71 patients with confirmed chikungunya diagnosis by RT-qPCR, monitored in a cohort to collect information on the chronicity of arthralgia or symptom resolution and to obtain biological samples. Clinical and sociodemographic characteristics were assessed at visits conducted 0-7 and 10-45 days after symptom onset (DPS), respectively. For a subgroup (n=25), at least one additional follow-up with sample collection was conducted beyond 45 days after symptom onset. In these samples, anti-CHIKV IgM and IgG antibodies, the levels of 19 cytokines, chemokines, and growth factors were analyzed, as well as CHIKV viral load and full genome sequencing. **RESULTS:** Most of the patients studied were female, accounting for 67% (48/71) of the total, with a median age of 40 years. Among them, 59% (42/71) developed chronic arthralgia (>90 days after symptom onset). These individuals exhibited a higher frequency of edema and were, on average, older during the initial phase of the disease (0-7 DPS) compared to the group that did not develop chronic arthralgia. Paired samples showed seroconversion of IgM and IgG antibodies in 96% (70/71) and 100% (71/71) of patients, respectively. Approximately 30% of those who developed chronic arthralgia maintained detectable IgM antibody levels for more than two years after symptom onset. Furthermore, elevated levels of GM-CSF and IP-10/CXCL10 were observed in samples collected between 0-7 and 10-45 DPS, respectively, in the group that developed chronic arthralgia. On the other hand, viral load was not associated with the development of chronic arthralgia, and the mutations found in viral genomes had no clinically significant impact. **CONCLUSIONS:** The presence of edema and older age were identified in this study as factors associated with the development of chronic arthralgia. The use of opioids during the early phase of the disease was more common in patients who progressed to chronic arthralgia, suggesting more severe symptoms and the need for specific pain management strategies. Intrinsic characteristics of the individual and immune response appear to play a more important role than viral factors in the progression to chronic arthralgia.

Keywords: Chikungunya. Chronic arthralgia. Biomarkers. Viral load.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHIKV	Vírus Chikungunya
COVID-19	Coronavirus disease 2019
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DENV	Vírus Dengue
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
GCSF	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>
GMCSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
HUPES	Hospital Professor Edgard Santos
IFN-α2	Interferon alfa 2
IFN-γ	Interferon gama
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IL-8/CXCL8	Interleucina-8
IP-10/CXCL10	<i>Interferon Gamma-Induced Protein 10</i>
LPBM	Laboratório de Patologia e Biologia Molecular
MCP-1/CCL2	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MIG/CXCL9	Monokine Induced by Gamma Interferon
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-qPCR	Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
TNF	Fator de Necrose Tumoral

UFBA	Universidade Federal da Bahia
USSM	Unidade Saúde de São Marcos
VEGFA	Fator de Crescimento Endotelial Vascular A
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Vírus e Transmissão	14
2.2	Epidemiologia	15
2.3	Manifestações clínicas	15
2.4	Diagnóstico e tratamento	17
2.5	Imunopatogênese da infecção pelo vírus Chikungunya	18
2.6	Biomarcadores e fatores de risco para progressão da doença	19
3	HIPÓTESES	21
4	OBJETIVOS	22
4.1	Objetivo Geral	22
4.2	Objetivos Específicos	22
5	RESULTADOS	23
5.1	Manuscrito 1 - Objetivo 1	23
5.1.1	Manuscrito 1	23
5.1.2	Apresentação	23
5.2	Manuscrito 2 - Objetivo 2, 3, 4	40
5.2.1	Manuscrito 2	40
5.2.2	Apresentação	40
6	DISCUSSÃO	73
7	CONCLUSÃO	77
8	REFERÊNCIAS	78
	ANEXOS	85
	APÊNDICES	95

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O vírus Chikungunya (CHIKV) foi descrito pela primeira vez em 1952 na Tanzânia e, desde então, causou surtos em diversos países na África, Ásia e Europa. Este vírus teve sua primeira detecção autóctone na América Latina em 2013, registrada no Caribe e, no Brasil em 2014. Desde então, tornou-se um desafio significativo para a saúde pública devido à sua rápida disseminação e ao impacto clínico que causa na população. (Donalisio *et al.*, 2017; ECDC, 2017; Powers, 2010; World Health Organization, 2017). A infecção pelo CHIKV em hospedeiros humanos pode resultar em uma doença com amplo espectro clínico com sintomas que variam de leves até intensos e debilitantes e que, em alguns casos, pode levar a óbito. Os sintomas mais comuns em indivíduos infectados incluem febre, artralgia intensa, edema articular, mialgia e dor de cabeça (Krutikov *et al.*, 2016; Manson, 2016; Silva *et al.*, 2019). Em alguns casos, a artralgia pode persistir por vários meses e até anos após a infecção (Ninla-Aesong *et al.* 2019; Schilte *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2021).

A busca de fatores de risco e biomarcadores que possam prever a artralgia crônica pós-infecção pelo CHIKV, são de fundamental importância para orientar o tratamento, o prognóstico e o desenvolvimento de estratégias de prevenção. A persistência da artralgia representa um grande desafio para a saúde pública, afetando a qualidade de vida dos pacientes podendo gerar impactos socioeconômicos (Couturier *et al.*, 2012; Queyriaux *et al.*, 2008). Além disso, existem várias lacunas na compreensão dos mecanismos que levam ao desenvolvimento à artralgia crônica pós-infecção pelo CHIKV, o que dificulta o desenvolvimento de abordagens terapêuticas eficazes e definitivas. Mesmo após uma década desde a introdução do CHIKV nas Américas e no Brasil, muitas questões relacionadas a seus mecanismos de transmissão, espectro clínico e imunopatogênese da artralgia crônica após a infecção pelo CHIKV não estão completamente esclarecidas.

Portanto, o entendimento dos fatores que contribuem para a persistência da artralgia após a infecção pelo CHIKV podem ajudar a direcionar estratégias de tratamento, incluindo intervenções farmacológicas direcionadas aos mecanismos específicos envolvidos na patogênese da artralgia crônica, bem como a implementação de medidas preventivas para reduzir a incidência e a gravidade dos sintomas em pacientes com perfis de risco.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Vírus e Transmissão

O CHIKV é um arbovírus do gênero *Alphavirus* pertencente à família *Togaviridae* identificado pela primeira vez na Tanzânia em 1952 (Lumsden, 1955; Robinson, 1955). O nome deste vírus se origina da palavra *chikungunya*, que na língua Makonde significa “aquele que se curva”, referência à dor articular intensa que alguns indivíduos experimentam quando infectados por este vírus (Petitdemange *et al.*, 2015; Suhrbier *et al.*, 2012).

O CHIKV é um vírus de RNA fita simples sentido positivo, constituído essencialmente de um envelope de fosfolipídeos, um capsídeo e 2 fases de leitura aberta – *open reading frames* (ORFs). Uma das ORFs codifica 4 proteínas não estruturais (NsP1, NsP2, NsP3 e NsP4) e a outra codifica as proteínas estruturais (capsídeo, glicoproteínas do envelope [E1, E2, E3], e 6K). Os vírions de CHIKV são partículas envelopadas esféricas medindo cerca de 70nm de diâmetro. Na superfície do vírion, as proteínas E1 e E2 se unem em heterodímeros formando *spikes*, responsáveis pelo reconhecimento e fusão da membrana do vírion com a superfície das células-alvo (Metz *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2019). Três genótipos distintos de CHIKV já foram descritos até o momento: oeste africano, leste-centro-sul africano (ECSA) e asiático (Machado *et al.*, 2019). Dos quais, o ECSA e o Asiático já foram identificados no Brasil (Faria *et al.*, 2016; Nunes *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2019; Teixeira *et al.*, 2015).

A transmissão do CHIKV aos seres humanos ocorre, principalmente, pela picada de mosquitos infectados do gênero *Aedes*, que são os principais vetores da doença (WEAVER; FORRESTER, 2015). No entanto, outras formas de transmissão do CHIKV têm sido demonstradas como a transmissão vertical, onde o vírus é transmitido da mãe para o feto durante a gravidez, especialmente quando a infecção ocorre durante o último trimestre. Essa via de transmissão pode resultar em complicações para o feto, incluindo malformações congênitas e problemas neurológicos (Evans-Gilbert, 2017; Oliveira *et al.*, 2018; Ramful *et al.*, 2007). Além disso, estudos que detectaram RNA CHIKV em amostras de doadores de sangue (Petersen *et al.*, 2014; Simmons *et al.*, 2016) e no sêmen (Bandeira *et al.*, 2016; Cardona-Ospina *et al.*, 2018) apontam para a possibilidade da transmissão do CHIKV por transfusão de sangue e por via sexual. Essas formas não-convencionais de transmissão do CHIKV destacam a importância de estratégias abrangentes de diagnóstico e controle para prevenção da doença, que vão além do controle de vetores. A triagem de doadores de sangue, cuidados durante a gravidez e a

promoção de práticas sexuais seguras podem ser fundamentais para reduzir a incidência e o impacto da doença.

2.2 Epidemiologia

O primeiro caso autóctone de CHIKV no Brasil foi registrado em setembro de 2014 no município do Oiapoque, estado do Amapá e na cidade de Feira de Santana, Bahia (Brasil, 2014; Teixeira *et al.*, 2015). Em seguida, no mesmo mês, os primeiros casos foram registrados na cidade de Salvador pelo Centro de Informações Estratégicas em Vigilância em Saúde (CIEVS) (CIEVS-SSA, 2014). A Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (SESAB) registrou o o maior número de casos suspeitos da doença (52.693) no estado em 2016. Nos anos seguintes, entre 2017 a 2019 houve um período de queda nas notificações de casos suspeitos, seguidos do aumento do número de casos entre 2020 a 2022 chegando a 42.569 casos suspeitos em 2020 (SESAB, 2020). É importante salientar que em 2020 o mundo foi atingido com a pandemia do vírus SARS-CoV-2, causador da COVID-19, que impactou e vitimou milhões de pessoas.

Durante a pandemia, foram estabelecidos períodos de quarentena, que isolaram milhares de pessoas em suas casa na Bahia, no Brasil e no mundo. Além disso, a pandemia de COVID-19 sobrecarregou os serviços de saúde, o que pode ter subestimado o número real de casos em 2020 (Goldani *et al.*, 2020). Ainda sim, o sistema de notificações da SESAB foi capaz de detectar a epidemia de CHIKV que ocorreu nesse período. No ano de 2022 foram notificados 24.255 casos suspeitos de chikungunya, o que representa um aumento de quase 2 vezes no número de casos quando comparado com os anos de 2017 e 2019 e aumento de cerca de 5 vezes em relação ao ano de 2018. Em 2023, o número de casos voltou a diminuir, sendo notificados 15.696 casos. Já em 2024, até a semana epidemiológica 17, foram notificados 22.883 casos prováveis, o que representa um aumento de 45% no número de casos registrados durante todo o ano de 2023 (**Gráfico 1**) reforçando a dinâmica sazonal da transmissão do CHIKV na Bahia (SESAB, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024).

2.3 Manifestações Clínicas

A infecção pelo CHIKV pode causar artralgia intensa, frequentemente incapacitante, e é considerada o sintoma mais marcante da doença. A literatura mais recente classifica a Chikungunya em 3 fases de acordo com a duração da dor articular: fase aguda, pós-aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada por febre, artralgia intensa, rash cutâneo, mialgia, edema

articular, dor de cabeça e prostração e pode durar até 14 dias após o início dos sintomas. A fase subaguda é caracterizada pela ausência de febre e persistência da artralgia entre 15 e 90 dias após o início dos sintomas. A fase crônica é caracterizada também por ausência de febre e persistência da dor articular por períodos acima de 90 dias de duração (De Brito *et al.*, 2020; Diniz *et al.*, 2017).

Estudos apontam que a frequência de casos assintomáticos de infecção por CHIKV pode variar de 3 a 47%, e as infecções sintomáticas podem atingir de 53 a 97% dos casos. Esta variação nas frequências das manifestações clínicas sintomáticas e assintomáticas pode ocorrer em função do tempo desde o início dos sintomas até o momento da coleta das amostras, de diferentes, critérios de definição de caso e área geográfica dos estudos (Appassakij *et al.*, 2013, 2020; Staples; Hills, 2016). De forma geral, é estimado que até 60% das pessoas que se infectam com CHIKV possam desenvolver artralgia crônica (Schilte *et al.*, 2013) dependendo do cenário epidemiológico, dos critérios de diagnóstico, de acompanhamento e desfecho do quadro clínico dos participantes.

Um dos principais aspectos relacionados à artralgia crônica pós infecção pelo CHIKV, além da dor intensa e prostração, é o impacto causado na rotina e qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Além da limitação dos movimentos, a doença decorrente da infecção por CHIKV pode causar sintomas como astenia, alopecia, prostração e até mesmo desencadear a depressão (Lagos-Gallego *et al.*, 2018; Lima Martins *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2021; Van Aalst *et al.*, 2017). Apesar de menos frequentes, a infecção pelo CHIKV pode causar manifestações clínicas atípicas e graves como meningoencefalites, Síndrome de Guillain-Barré, neuropatias, retinite, uveíte, miocardite, pericardite, dermatoses, insuficiência renal aguda, pneumonia e hepatite, podendo evoluir para óbito, em alguns casos (Economopoulou *Et Al.*, 2009; Ninla-Aesong *et al.*, 2020; Vairo *et al.*, 2019).

Estudos recentes têm demonstrado que a resposta imune e homeostase desreguladas estão associadas com óbitos decorrentes da infecção por CHIKV (Souza *et al.*, 2024). Embora alguns estudos apontem que idade avançada e condições médicas preexistentes como doença renal crônica, cardiopatias e diabetes são fatores de risco para desfechos fatais (Oliveira *et al.*, 2022; Simião *et al.*, 2019), as mortes associadas à infecção por CHIKV podem ocorrer também em populações consideradas de baixo risco como indivíduos jovens e sem comorbidades (Oliveira *et al.*, 2022; Faria *et al.*, 2016; Telmos *et al.*, 2021). Uma das razões é que a número de óbitos decorrentes da infecção por CHIKV pode estar subnotificado, já que para muitos casos graves o diagnóstico de chikungunya pode não ser considerado, principalmente quando o óbito decorre de causas indiretas (De Brito, 2017).

2.4 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico da Chikungunya pode ser feito por critérios clínicos-epidemiológicos e/ou diagnóstico laboratorial. Para o diagnóstico laboratorial são utilizados principalmente métodos sorológicos e de biologia molecular. A detecção direta do vírus pode ser realizada por isolamento viral ou pela detecção de RNA de CHIKV pela técnica de Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase convencional (RT-PCR) ou em tempo real (RT-qPCR) nas amostras de sangue dos pacientes nos primeiros 7 dias após o início dos sintomas (Appassakij *et al.*, 2013; Cabral-Castro *et al.*, 2016; Marques *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016). Métodos de biologia molecular são a primeira escolha para o diagnóstico de CHIKV, visto que possuem alta sensibilidade e especificidade em amostras de sangue (Santiago *et al.*, 2018).

No entanto, esta técnica tem um custo elevado e necessita de infraestrutura e pessoal capacitado para sua execução. A detecção de anticorpos IgM e/ou IgG nas amostras de sangue utilizando o método de *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) e testes imunocromatográficos (testes rápidos), podem ser consideradas como métodos de avaliação complementar ou como alternativas aos métodos de biologia molecular na ausência de infraestrutura para realizar o ensaio ou na indisponibilidade de obtenção amostras de pacientes com menos de 7 dias de sintomas (Andrew *et al.*, 2022).

Entretanto, estudos recentes têm apontado que os anticorpos IgM podem permanecer na corrente sanguínea por períodos prolongados, com evidências sugerindo que esses anticorpos podem persistir até 35 meses após a infecção (Pierro *et al.*, 2015a; Costa *et al.*, 2021). No entanto, as razões pelas quais essa persistência ocorre em alguns indivíduos ainda não estão esclarecidas. Diante disso, para diagnósticos baseados apenas na detecção de imunoglobulinas, recomenda-se a coleta de amostras pareadas para verificar a soroconversão de anticorpos, evitando interpretações equivocadas.

Não existe tratamento específico para a infecção pelo vírus CHIKV. O manejo clínico na fase aguda é geralmente realizado com tratamento medicamentoso sintomático, enquanto na fase crônica pode incluir o uso de anti-inflamatórios não esteroides, opioides, imunossupressores, corticoides e modificadores da resposta imune. Além do acompanhamento com médico reumatologista, a realização de atividades físicas, intervenções de reabilitação e fisioterapia aquática são recomendados para pacientes com artralgia crônica. No entanto, não existe consenso sobre as doses, posologia, forma farmacêutica nem sobre o tipo de tratamento clínico e sua duração (Diniz *et al.*, 2017).

Por outro lado, nos últimos anos, houve um progresso significativo no desenvolvimento de vacinas para o CHIKV. Os resultados preliminares têm sido promissores, apresentando alta imunogenicidade e poucos efeitos colaterais (Rosso *et al.*, 2024). Fruto de uma parceria entre o instituto Butantan e a Empresa Valneva, a vacina VLA1553 é candidata a ser a primeira vacina de CHIKV do Brasil e a primeira a ser utilizada em áreas endêmicas. As duas instituições assinaram um acordo em janeiro de 2021 para o desenvolvimento e manufatura desta vacina de vírus atenuado. A vacina VLA1553 foi aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos em novembro de 2023 e em junho de 2024 foi também aprovada no Canadá e na Europa. Atualmente, a solicitação de regulamentação da vacina foi submetida à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e se aprovada, poderá ser disponibilizada via Sistema Único de Saúde (SUS) (Valneva, 2024; McMahon *et al.*, 2024).

2.5 Imunopatogênese da Infecção pelo Vírus Chikungunya

O vírus CHIKV é transmitido aos seres humanos principalmente pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*. Após o repasto sanguíneo do mosquito infectado, as partículas virais são inoculadas e podem infectar células residentes da pele como queratinócitos, melanócitos e fibroblastos causando resposta inflamatória inicial e manifestações cutâneas (Van Duijl-Richter *et al.*, 2015). O CHIKV entretanto, induz resposta local de citocinas e quimiocinas que recrutam macrófagos, células *natural killers* (NK) e neutrófilos para o sítio inflamatório, além de interagir com células dendríticas residentes, o que leva à disseminação viral para corrente sanguínea através de monócitos infectados ou partículas virais livres, onde atinge outros tecidos e órgãos do corpo, como articulações, músculos, fígado, rins, coração e cérebro (MillsapPS *et al.*, 2022). A presença de CHIKV em músculos e articulações causa dano tecidual devido a replicação viral e infiltração celular, causando edema e degradação do revestimento sinovial e periósteo (Fox; Diamond, 2022; Goupil *et al.*, 2016). A replicação viral ocorre também nos órgãos-alvo resultando em elevada viremia, que geralmente se resolve em até 10 dias após a infecção (Fox; Diamond, 2022; NG, 2017).

Por ser um vírus de RNA fita simples, o CHIKV pode ser detectado pelos *toll like receptor 7* (TLR-7), ativando então uma cascata de sinalização que induz a produção de interferons (IFN) e ativação de células B (Browne, 2012; Silva; Dermody, 2017). Durante a infecção pelo CHIKV, níveis séricos elevados de diversas citocinas (IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15 e IFN- α) e quimiocinas (MIG/CXCL9, IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10, MCP-1/CCL2) pró-inflamatórias já foram descritas, indicando resposta inflamatória intensa durante

a fase aguda da doença, recrutamento de leucócitos para as áreas infectadas e ativação de linfócitos B (Ferreira *et al.*, 2021; Wauquier *et al.*, 2011). A resposta imune humoral é desencadeada pela proteína E2 de envelope do CHIKV (Amaral *et al.*, 2021; Tanabe *et al.*, 2018). Não se sabe ao certo quanto tempo os anticorpos permanecem no organismo e a duração da imunidade adquirida da doença, embora a persistência de IgM anti-CHIKV por mais de 2 anos após a infecção já tenha sido descrita (Costa *et al.*, 2021), assim como a produção de IgG anti-CHIKV detectável no soro de pacientes por anos (Pierro *et al.*, 2015). O entendimento dos mecanismos envolvidos na persistência de anticorpos IgM e sua possível correlação com persistência de CHIKV no organismo e/ou resposta autoimune ainda precisam ser explorados de maneira mais abrangente.

2.6 Biomarcadores e Fatores de Risco para Progressão da Doença

Alguns estudos têm demonstrado que níveis elevados de carga viral e de mediadores imunológicos, sexo feminino, idade e algumas características clínicas de fase aguda podem estar associados com a progressão da doença (Van Aalst *et al.*, 2017). Entretanto, não há ainda uma definição sobre a causa e efeito desses fatores de risco com a artralgia crônica, a exemplo dos níveis de carga viral na fase inicial da doença. Se, por um lado, alguns estudos apontam níveis elevados ou a persistência da carga viral na corrente sanguínea durante a fase aguda como fatores correlacionados com a persistência da artralgia ou a gravidade dos sintomas. (Chow *et al.*, 2011; Huits *et al.*, 2018), outros estudos não observaram esta correlação (SILVA *et al.*, 2021). Por outro lado, a detecção de RNA de CHIKV em diferentes fluidos corporais como saliva, urina, secreções vaginais, sêmen e leite materno tem sido cada vez mais frequentemente descritos na literatura (Campos *et al.*, 2017; Ferreira Moreira, 2021; Martins *et al.*, 2022). Um estudo de Telmos e colaboradores, detectou RNA de CHIKV em 92.3% (36/39) de amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com sinais e sintomas neurológicos que evoluíram para óbito (Telmos *et al.*, 2021). Em alguns cenários, a detecção de CHIKV em outros tecidos é um marcador de casos mais graves e fatais. Portanto, é necessário entender de maneira mais abrangente a correlação da presença de CHIKV detectável e sua carga viral com demais fatores clínicos e mediadores da resposta imune.

Outras características como idade acima de 45 anos, desordens articulares preexistentes e maior intensidade das lesões articulares na fase aguda são considerados fatores de risco para a cronificação da doença (BRASIL, 2017). Além disso, sexo feminino também tem sido identificado como um fator de risco para a persistência dos sintomas. A identificação precoce

desses fatores é essencial para a implementação de medidas preventivas e terapêuticas adequadas, visando minimizar o impacto da doença na qualidade de vida dos pacientes (Silva *et al.*, 2021).

Citocinas, quimiocinas, interferons, fatores de crescimento e outros mediadores da resposta imune têm sido amplamente estudados nos últimos anos como potenciais biomarcadores de risco ou proteção a progressão da doença causada pelo CHIKV. Uma revisão sistemática realizada por Ferreira *et al.*, (2021), avaliou 17 estudos publicados entre 2009 e 2019, apontando níveis elevados de IL-6 (6 estudos), MCP-1/CCL2 (3 estudos), TNF- α (2 estudos) assim como IL-12, INF- α , IL-13, INF- γ , GM-CSF, IP-10/CXCL10, IL-10, IL-4, IL-8/CXCL8, MIG17/CXCL9 dentre outras citocinas pró-inflamatórias. Além disso, níveis reduzidos de alguns mediadores como RANTES/CCL5, ferritina, eotaxina, IL-17a e TGF- β estavam associados com artralgia crônica. A associação de carga viral elevada com cronificação da artralgia foi descrita e correlacionada com níveis mais altos de IFN- α , IL-6, IL-12, IP-10/CXCL10 e MCP1/CCL2 (Chow *et al.*, 2011; Reddy *et al.*, 2014).

3 HIPÓTESES

- A carga viral de CHIKV no soro de pacientes na fase inicial da doença é distinta entre grupos de pacientes e está correlacionada com o desfecho clínico.
- A incidência de artralgia crônica é mais alta em grupos específicos de pacientes com base em características sociodemográficas.
- Mediadores imunológicos séricos como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e anticorpos IgM e IgG podem estar associados com o desenvolvimento de artralgia crônica.
- Características virais como genótipo e mutações podem influenciar o desfecho clínico
- A cinética dos mediadores imunológicos difere entre pacientes com resolução completa dos sintomas e aqueles que desenvolvem artralgia crônica.
- Pacientes com artralgia crônica apresentam um conjunto de características específicas e diferentes daqueles que apresentam resolução dos sintomas após a infecção pelo CHIKV.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Investigar fatores de risco e biomarcadores para desenvolvimento da artralgia crônica após a infecção pelo CHIKV durante o curso da doença.

4.2 Objetivos Específicos

- Determinar os níveis de anticorpos IgM e IgG anti-CHIKV no soro de pacientes durante o curso da doença;
- Determinar a carga viral e características filogenéticas de CHIKV no soro de pacientes com confirmação laboratorial;
- Descrever o perfil e cinética de biomarcadores anti-inflamatórios, pró-inflamatórios e regulatórios (quimiocinas e citocinas e fatores de crescimento) no soro de pacientes positivos por CHIKV;
- Avaliar perfis de risco para o desenvolvimento de artralgia crônica considerando os níveis de anticorpos, biomarcadores e características clínicas e sociodemográficas dos pacientes.

5 RESULTADOS

5.1 Manuscrito 1 - Objetivo 1

Determinar os níveis de anticorpos IgM e IgG durante o curso da doença (amostras de fase aguda, convalescente e após 90 dias do início dos sintomas)

5.1.1 Manuscrito 1

Artigo submetido ao periódico *International Journal of Infectious Diseases (IJID)*
Este trabalho foi adicionalmente apresentado e concorreu ao *Young Investigator Award* no *Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Chicago, USA, em outubro de 2023 e como forma de pôster durante o Congresso Brasileiro de Medicina Tropical 2024 - São Paulo, setembro de 2024.

Long-term persistence of serum IgM antibodies against chikungunya virus in patients with chronic arthralgia

Leile Camila Jacob-Nascimento¹, Moyra M. Portilho¹, Rosângela O. Anjos¹, Moises Sousa¹, Viviane Machicado², Adriane Paz², Lorena Gomes¹, Uriel Kitron³, Scott C. Weaver⁴, Mittermayer Barreto Santiago², Mittermayer G. Reis^{1,5,6}, Guilherme S. Ribeiro^{1,5*}

5.1.2 Apresentação

Este artigo contempla a investigação proposta no primeiro objetivo específico da presente tese que teve como objetivo principal investigar os níveis de anticorpos IgM e IgG durante o curso da doença, além de avaliar se a presença e os níveis dos anticorpos avaliados possuem correlação com a persistência da artralgia.

Long-term persistence of serum IgM antibodies against chikungunya virus in patients with chronic arthralgia

Leile Camila Jacob-Nascimento¹, Rosângela O. Anjos¹, Moyra M. Portilho¹, Viviane M. Cavalcanti², Adriane S. Paz², Lorena G. Santos¹, Moisés S. Sousa¹, Julia G. Costa¹, Mariane R. Silva¹, Patrícia S. S. Moreira¹, Uriel Kitron³, Scott C. Weaver⁴, Mittermayer B. Santiago², Mittermayer G. Reis^{1,5,6}, Guilherme S. Ribeiro^{1,5*}

¹ Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil;

² Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Brazil

³ Emory University, Atlanta, USA;

⁴ World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses, University of Texas Medical Branch, Galveston, USA;

⁵ Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil;

⁶ Yale University, New Haven, USA;

* **Correspondence:**

Corresponding Author

guilherme.ribeiro@fiocruz.br

Abstract

Objectives. This study examined how long IgM antibodies against chikungunya virus (CHIKV) remain detectable following an acute infection.

Method. A commercial ELISA was used to assess the frequency of anti-CHIKV IgM antibody detection over time in 145 longitudinal serum samples obtained from 45 laboratory (PCR)-confirmed chikungunya patients who developed chronic arthralgia in Brazil (two to six samples per patient).

Results. Among the samples obtained within seven days post-acute symptoms onset (DPSO), 13% (6/45) were IgM-positive, while among those obtained between 10-120 DPSO, 100% (62/62) were IgM-positive. The positivity rate for samples obtained between 121-720, 721-900, 901-1,080, 1,081-1,260, and >1,260 DPSO was 62% (5/8), 35% (6/17), 12% (1/8), 33% (1/3) and 50% (1/2), respectively. Notably, among the 21 patients with at least one sample collected >720 DPSO, 7 (33%) still had detectable anti-CHIKV IgM, suggesting that about one-third of chikungunya patients with chronic arthralgia can maintain anti-CHIKV IgM for >2 years after acute disease.

Conclusions. Our findings reveal that the persistence of anti-CHIKV IgM antibodies can be longer than typically seen following acute RNA virus infections, which has significant implications for chikungunya diagnosis and surveillance. Further investigations are needed to determine whether long-term IgM maintenance occurs in patients with non-chronic chikungunya.

Keywords: Chikungunya, Serology, IgM antibody, Diagnosis, Surveillance.

1 Introduction

Chikungunya virus (CHIKV) is a vector-borne, single-stranded RNA virus that belongs to the *Togaviridae* family and the *Alphavirus* genus. During the 21st century, CHIKV emerged as a significant global health concern, spreading to new tropical and subtropical regions worldwide and causing large epidemics [1]. Most CHIKV infections are symptomatic and manifest as fever, headache, rash, myalgia, swollen joints, and especially arthralgia, which tends to be severe and can evolve chronically, lasting months to years after infection [2].

Human CHIKV infection occurs when viral particles are inoculated into the skin through the bite of female *Aedes* mosquitoes during a blood meal [3]. The virus then begins replicating locally in macrophages, fibroblasts, and endothelial cells before spreading to lymphoid tissues and the bloodstream, reaching organs like the liver, joints, and muscles [4]. As viral replication continues in these target organs, high viremia develops, which typically resolves within ten days of infection [5,6]. The immune response to CHIKV involves B cell activation and production of specific neutralizing antibodies [7,8]. Although the exact duration of detectable antibodies is not fully understood, IgM antibodies are typically expected to remain in the bloodstream for about three months after most acute RNA viral infections, whereas IgG antibodies can persist for several years or even for life [9].

The laboratory diagnosis of chikungunya is primarily performed through the detection of CHIKV RNA by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) or through serological techniques to identify antibodies against CHIKV, such as immunosorbent assay (ELISA) and rapid immunochromatographic tests. An acute CHIKV infection is typically confirmed by a CHIKV-positive RT-PCR in an acute-phase serum sample (obtained 0-7 days post-symptom onset [DPSO]) or by the detection of anti-CHIKV IgM seroconversion between acute- and convalescent-phase (>7 DPSO) serum samples. In contrast, while detecting anti-CHIKV IgM antibody in an acute-phase sample is commonly used to support an acute infection, it may occasionally represent a prior, recent (but not acute) infection [10–12]. Lastly, concurrently detecting anti-CHIKV IgG and IgM might suggest a recent infection, while the sole presence of IgG may indicate a non-recent past infection [12].

However, a few studies have suggested that IgM antibodies against CHIKV can be detectable after three [13] and even up to 13 years after CHIKV infection [16]. Given that IgM-based serological methods are widely used for chikungunya diagnosis, the findings that anti-CHIKV IgM can persist for long periods raise concerns regarding the correct interpretation of a positive

IgM-based test, as it may represent a previous infection rather than an acute or recent infection, especially in settings where large CHIKV epidemics have occurred or endemic CHIKV transmission has been established. Therefore, this study aimed to assess the frequency of IgM and IgG antibody detection over time in serum samples from a cohort of laboratory-confirmed chikungunya patients from Salvador, Brazil.

2 Methods

Participants selection

The patients included in this investigation had the laboratory diagnosis of acute CHIKV infection made during their participation in a surveillance study to detect arbovirus infection. The patients enrolled sought healthcare due to an acute febrile or exanthematous illness in an emergency facility in Salvador, Brazil. Although the surveillance study has been ongoing since January 2009, all the chikungunya patients included in this investigation were diagnosed between June 2019 and March 2020, when large epidemics spread throughout Salvador. The inclusion criteria for the surveillance study during this period were age ≥ 6 months at surveillance enrollment and having an axillary temperature $\geq 37.8^{\circ}\text{C}$ or reported fever or skin rash lasting ≤ 7 days.

During surveillance enrollment, an interview was conducted to obtain clinical and epidemiological data, and an acute-phase blood sample was collected by venipuncture. Participants were invited to return 10-45 days later to report on the evolution of symptoms and to collect a convalescent-phase blood sample. If the participant could not return to the health unit, a research team attempted to collect the convalescent-phase clinical data and blood sample during a visit to the participant's home. Interview data were recorded in an electronic form and were automatically transferred into a database using the REDCap (Research Electronic Data Capture) software [14]. After collection, blood samples were refrigerated ($2-8^{\circ}\text{C}$) at the health unit until cold transportation to our laboratory at Fundação Oswaldo Cruz on the same day. There, they were centrifuged, and the sera were aliquoted and stored at -20°C and -80°C until being tested by serological and molecular methods. Additional details on the long-term surveillance study had been previously reported [15–17].

2.1 Laboratory diagnosis

Participants enrolled in the surveillance study had the diagnosis of an acute CHIKV infection confirmed based on (1) a positive result for CHIKV in the Triplex qRT-PCR, which can detect

RNA from CHIKV, ZIKV and DENV according to the protocols from the Centers for Disease Control and Prevention [18]; or (2) detection of CHIKV IgM seroconversion between acute- and convalescent-phase serum samples using the CHIKjj Detect™ IgM ELISA kit (InBios International, Seattle, United States). In addition, all participants in the surveillance study were also tested by ELISA for the detection of anti-DENV IgM antibodies (Panbio Diagnostics, Brisbane, Australia) and DENV NS1 antigen (Panbio Diagnostics, Brisbane, Australia). All assays were performed following the manufacturer's instructions.

2.2 Chikungunya patients' follow-up

Participants with a laboratory-confirmed acute CHIKV infection were contacted by telephone and invited for an outpatient follow-up at the rheumatology service of the Universidade Federal da Bahia Hospital complex. Those interested in the follow-up had an appointment with a rheumatologist scheduled and, during the consultation, were examined, oriented, and treated based on Brazilian guidelines for chikungunya management [11,19]. Patients had regular return appointments scheduled as indicated by the rheumatologist, according to the patient's needs. Data on disease signs and symptoms, physical exams, and medical care were obtained during these visits using the Research Electronic Data Capture (REDCap) software. Blood samples were also collected, refrigerated, and transported on the same day to the Oswaldo Cruz Foundation laboratory, where they were processed, aliquoted, and stored at -80°C until testing.

2.3 Detection of IgM and IgG antibodies against CHIKV

The final group of participants included in this study comprised laboratory-confirmed chikungunya cases identified during the surveillance study between June 2019 and March 2020 who attended the rheumatology outpatient clinic and had at least one blood sample collected during the rheumatological follow-up. Although collecting a convalescent-phase sample during the surveillance study was not mandatory, only one patient failed to provide it. Additionally, two patients had both the convalescent-phase and first outpatient clinic samples collected within 10-30 days after infection, but only the most recent sample was considered, as they were from the same time window.

The same CHIKV IgM ELISA used in the surveillance study was used to determine the presence of anti-CHIKV antibodies in follow-up samples obtained during outpatient appointments. The presence of IgG antibodies against CHIKV was also verified in all the study participants' serum samples using the IgG ELISA from Euroimmun (cat no. EI 293a-9601 G, Euroimmun, Luebeck, Germany). Finally, all the samples studied – those collected at the acute and convalescent

phases as part of the surveillance study, as well as those collected during rheumatological follow-up, underwent the same Trioplex qRT-PCR protocol used in the surveillance study. This was done to determine how long they remained positive for CHIKV and to assess whether their positivity was associated with IgM positivity.

2.4 Data Analysis

All clinical data and patient laboratory results were stored in the REDCap digital database [14] before being exported and analyzed using STATA version 13 and Excel software. Clinical, demographic, and laboratory characteristics were described using absolute and relative frequencies for categorical variables and medians and minimum-maximum or interquartile (IQR) ranges for continuous variables. The positivity rates for the presence of anti-CHIKV IgM and IgG, and CHIKV RNA detected by RT-qPCR, were calculated as relative frequencies for the following periods: 0-7, 10-30, 31-60, 61-90, 91-120, 121-720, 721-900, 901-1,080, 1,081-1,260, and >1,260 DPSO. These periods were arbitrarily defined based on the availability of serum samples within each period. The positivity rate for the detection of anti-CHIKV IgM was also calculated for the patients with at least one sample collected >720 DPSO. Individuals with missing information for any variable were excluded from the analysis. Lastly, we used frequencies or medians and interquartile ranges to compare demographic, clinical, and laboratory characteristics between the following groups of patients: those with IgM maintenance for >720 DPSO, those without IgM maintenance for >720 DPSO, and those not evaluated after 720 DPSO due to lack of sample collection. Given the small sample size per group and the exploratory character of this comparison, a statistical test to assess significant differences was not employed.

2.5 Ethical Aspects

This study was approved by the Institutional Review Board of the Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (CAAE: 55904616.4.0000.0040). Written informed consent was used during both enrollment in the surveillance study and the first consultation at the rheumatological clinic to explain the study's aims, procedures, risks, and benefits. The forms were signed by participants ≥ 18 years old and parents of participants < 18 . Minors (aged 5-17) also signed an informed assent form.

3 Results

Between June 2019 and March 2020, 1,039 patients with an acute febrile or exanthematous illness were enrolled in the surveillance study, of whom 395 were diagnosed with acute chikungunya; 382 (96.7%) by RT-qPCR with or without detection of IgM seroconversion, and 13 (3.3%) by IgM seroconversion alone. Although telephone contact attempts were made for 300 of the 395 patients, only 82 responded, and 47 accepted the invitation for a follow-up visit at the rheumatological clinic and attended at least once. Of those 47 visiting the clinic, 45 had at least one additional blood sample collected, comprising the group of patients of this investigation.

These 45 patients attended the outpatient rheumatological clinic between October 2019 and April 2023. The median, minimum, and maximum intervals from symptom onset and the last clinic visit were 170, 29, and 1,316 days, respectively. Their diagnosis of CHIKV infection was based on both positive RT-qPCR and IgM seroconversion in 36 (80.0%) patients, solely on a positive RT-qPCR in 7 (15.6%) patients, 6 of whom also had a positive IgM on the first sample, and one who did not have a convalescent-phase serum sample for seroconversion evaluation, and solely on IgM seroconversion in 2 (4.4%) patients. Most (33.73%) patients were women and their median age was 44 (IQR: 35-56; min-max range: 21-79) years (Table 1). All patients reported acute arthralgia during enrollment in the surveillance study, and all of them evolved with chronic arthralgia, defined by joint pain lasting >90 days [20]. However, arthralgia had an intermittent character for some of them, who denied joint pain in a few visits (Table 1).

Anti-CHIKV antibodies were investigated in the acute-phase serum samples from all 45 patients, in the convalescent-phase samples collected during the surveillance study from 42 (93.3%) patients, and in at least one additional sample collected during the rheumatological follow-up. Overall, 145 samples were tested, and the median, minimum, and maximum number of serum samples tested per patient were 3, 2 and 6, respectively.

Among the 45 acute-phase samples collected within 7 DPSO, only 6 (13%) tested positive for anti-CHIKV IgM antibodies (Table 1; Figure 1). In contrast, all 62 samples collected from these 45 patients between 10 and 120 DPSO were IgM-positive. For the eight patients with serum samples obtained between four months and two years after symptoms onset (121-720 DPSO), 5 (62%) remained IgM-positive. For the 21 patients with at least one serum sample collected after two years of symptoms onset (>720 DPSO), 7 (33%) had detectable anti-CHIKV IgM. Notably, one patient's serum sample obtained 1,287 DPSO was still IgM positive (Figure 1).

Despite being RT-qPCR positive and showing IgG seroconversion, one patient did not have an IgM seroconversion detected, but their unique follow-up sample was obtained 133 DPSO (Figure 1, Patient ID 18).

IgG seroconversion occurred for 44 (98%) of 45 patients. The exception was an RT-qPCR-positive patient whose first sample, collected 0-7 DPSO, was already positive for both IgM and IgG. Anti-CHIKV IgG antibodies were detected in all follow-up samples from the 45 patients. In addition to the 43 acute-phase samples that were RT-qPCR positive for CHIKV, only two other samples, collected at 13 and 16 DPSO, were positive for CHIKV by RT-qPCR, with Ct values of 35.6 and 37.6, respectively. None of the 60 samples collected after 30 DPSO were RT-qPCR positive for CHIKV.

We used the ratios between the optical densities (OD) of the tested sample and the assay calibrator to estimate the amount of anti-CHIKV antibodies in each sample (Table 1). We observed a sharp increase in the anti-CHIKV IgM levels when comparing the samples obtained 0-7 DPSO to those obtained 10-30 DPSO. This was followed by a gradual increase, with IgM levels peaking in samples collected 61-90 DPSO. Afterwards, there was a steep decline in IgM levels in later samples. This pattern mirrored the trend in IgM positivity rates over time. Anti-CHIKV IgG levels also increased when comparing the median OD/calibrator ratios between samples obtained 0-7 DPSO and 10-30 DPSO. The increase continued through the 31-60 DPSO samples, reaching a peak in the 61-90 DPSO samples. However, unlike the IgM levels, IgG levels remained relatively stable in follow-up samples up to 901-1,080 DPSO. A gradual decline in IgG levels was observed in the subsequent samples, although their levels remained higher than those in the 10-30 DPSO group.

To explore whether demographic, clinical, and laboratory characteristics observed during the initial phases of chikungunya were related to the long-term persistence of anti-CHIKV IgM, we compared these characteristics among three groups: 7 patients with IgM persistence for >720 DPSO, 14 patients without IgM persistence for >720 DPSO, and 24 patients who were not evaluated after 720 DPSO due to lack of sample collection (Table 2). We found that the first group was older (median age: 52 years) compared to the other two groups (44 and 42 years, respectively). Additionally, they had a higher frequency of joint edema (85% vs. 66% and 65%) and a lower frequency of skin rash (28% vs. 40%, and 45%) during the acute illness. The median RT-qPCR CT level for the positive acute-phase samples was slightly lower in the first group (20.60) than in the other groups (22.65 and 24.47, respectively). No substantial differences were

observed in the frequency of comorbidities or the levels of anti-CHIKV IgM and IgG early in the course of the illness (at 0-7 and 10-30 DPSO).

4 Discussion

Our findings indicate that one-third of patients with chronic arthralgia following CHIKV infection can maintain detectable anti-CHIKV IgM in their serum for more than 2 years. Furthermore, of the 8 patients who had a serum sample obtained between 121 and 720 DPSO, 5 (62.5%) remained IgM-positive. One participant, followed for 1,287 DPSO (equivalent to 3.5 years or 43 months), still had anti-CHIKV IgM detectable in their serum. Previous studies have reported long-term IgM persistence following CHIKV infection, detected 10 [21], 12 [22], 13 [23,24] 18 [25], 35 [13] months and even 13 years post-infection – the longest duration reported in the literature [26]. These observations suggest that the kinetics of anti-CHIKV IgM following infection can vary significantly among individuals and, in some cases, it does not follow the expected pattern of declining to undetectable levels within 3-4 months.

When comparing patients with detectable anti-CHIKV IgM >720 DPSO to those without detectable IgM, no substantial differences were observed in signs, symptoms or the levels of IgM and IgG antibodies during the acute phase of illness. This suggests that the clinical characteristics of acute illness are not related to IgM persistence. Since only two convalescent-phase samples were RT-qPCR-positive and all samples collected after 30 DPSO were RT-qPCR-negative, we found no evidence to suggest that persistent viremia is linked to long-term IgM maintenance. Previous studies suggest that CHIKV may evade the immune system and persist in "deep sanctuaries" within joints and tissues, sustaining inflammation [27] which could potentially serve as a stimulus for the continued production of IgM antibodies. Additionally, the possibility of re-exposure to CHIKV cannot be ruled out, given that CHIKV established an endemic-epidemic transmission pattern in Salvador [28]

Our results, which provide evidence for the long-term maintenance of anti-CHIKV IgM, have significant implications for chikungunya diagnosis, patient management and disease surveillance. In regions that have experienced large CHIKV epidemics or where CHIKV is endemic, serology-based diagnostics may be misleading, as infections from months or even years prior could be interpreted as acute or recent infections. Mistaking past infections for current ones can delay accurate diagnosis, potentially leading to inadequate treatment (i.e. withholding fluid replacement for dengue patients or augmenting the use of anti-inflammatory drugs, which are commonly recommended for chikungunya-associated joint pain but are

contra-indicated in dengue patients due to the risk of bleeding complications). Additionally, patients with positive anti-CHIKV IgM from previous infections might be reported as acute chikungunya cases, misleading the assessment of the dynamics of CHIKV spread. Therefore, we recommend that IgM-based serological diagnosis be interpreted cautiously in regions previously hit by large epidemics or with endemic CHIKV transmission. Wherever possible, RT-PCR should be used as the diagnostic gold standard and paired blood samples should be collected to check for IgM seroconversion, allowing the differentiation between ongoing and prior infections.

This study has several limitations. First, the number and timing of samples collected during follow-up varied among participants, limiting a more consistent assessment of the IgM positivity at each time point. Second, antibody detection depends on the accuracy of the chosen method. In this study, we used ELISA, considered a standard technique for antibody detection. The ELISA test used was designed for the detection of IgM antibodies targeting the CHIKV envelope (E2/E1) proteins and has been validated by the Centers for Disease Prevention and Control (CDC) [29]. We have also evaluated its accuracy, finding it has a sensitivity of 92.4% for convalescent-phase samples from RT-PCR-confirmed CHIKV cases, and a specificity of 97.7% and 90.5% in acute- and convalescent-phase samples from non-CHIKV febrile cases (including dengue and Zika), respectively [30]. Third, the group comparison between patients with and without IgM persistence for >720 DPSO should be interpreted cautiously, as the small group sizes limit the ability to determine if variations are real or incidental. Finally, all patients in our study had chronic arthralgia, so the persistent IgM findings may not apply to patients who recover fully after acute or post-acute disease phases. Future studies should assess whether our results extend to patients without chronic symptoms or to individuals with asymptomatic CHIKV infections. They should also examine if long-term anti-CHIKV IgM correlates with the duration of arthralgia, which could suggest a shared underlying mechanism.

In summary, our findings suggest that patients with chronic arthralgia due to chikungunya exhibit varying rates of decline in anti-CHIKV IgM levels, with some remaining IgM-positive for years after infection. Further studies are needed to clarify the mechanisms underlying the sustained production of anti-CHIKV IgM antibodies at detectable levels. Specifically, studies should examine whether antigenic stimulus, such as viral persistence or CHIKV re-exposure, contributes to this process. Meanwhile, researchers, diagnostic developers and manufacturers should consider evaluating alternative target proteins or adjusting test cutoffs in IgM-based serological assays to help minimize detection of IgM signals from past infections. Until IgM

tests can accurately differentiate acute from past infections, physicians, laboratory staff and public health professionals from high-burden CHIKV regions should interpret IgM-based serological results for CHIKV with caution.

References

1. de Souza, W.M.; Ribeiro, G.S.; de Lima, S.T.S.; de Jesus, R.; Moreira, F.R.R.; Whittaker, C.; Sallum, M.A.M.; Carrington, C.V.F.; Sabino, E.C.; Kitron, U.; et al. Chikungunya: A Decade of Burden in the Americas. *Lancet regional health. Americas* 2024, 30, doi: 10.1016/J.LANA.2023.100673.
2. Kang, H.; Auzenberg, M.; Clapham, H.; Maure, C.; Kim, J.H.; Salje, H.; Taylor, C.G.; Lim, A.; Clark, A.; Edmunds, W.J.; et al. Chikungunya Seroprevalence, Force of Infection, and Prevalence of Chronic Disability after Infection in Endemic and Epidemic Settings: A Systematic Review, Meta-Analysis, and Modelling Study. *Lancet Infect Dis* 2024, 24, 488–503, doi:10.1016/S1473-3099(23)00810-1.
3. Coffey, L.L.; Failloux, A.B.; Weaver, S.C. Chikungunya Virus–Vector Interactions. *Viruses* 2014, 6, 4628–4663.
4. Millsapps, E.M.; M.; Underwood, E.C.; Hopkins, H.K.; Young, M.; Barr, K.L.; Franca, O.; De Paula, S.; Traverse, E.M.; Millsapps, E.M.; Underwood, E.C.; et al. Chikungunya Immunopathology as It Presents in Different Organ Systems. *Viruses* 2022, Vol. 14, Page 1786 2022, 14, 1786, doi:10.3390/V14081786.
5. Fox, J.M.; Diamond, M.S. Pathogenesis of Chikungunya Virus Immune-Mediated Protection And. *J Immunol References* 2022, 197, 4210–4218, doi:10.4049/jimmunol.1601426.
6. Ng, L.F.P. Immunopathology of Chikungunya Virus Infection: Lessons Learned from Patients and Animal Models. *Annu. Rev. Virol* 2017, 4, 413–440, doi:10.1146/annurev-virology.
7. Hawman, D.W.; Fox, J.M.; Ashbrook, A.W.; May, N.A.; Schroeder, K.M.S.; Torres, R.M.; Crowe, J.E.; Dermody, T.S.; Diamond, M.S.; Morrison, T.E.; et al. Pathogenic Chikungunya Virus Evades B Cell Responses to Establish Persistence. *Cell Rep* 2016, 16, 1326–1338, doi: 10.1016/j.celrep.2016.06.076.
8. Lum, F.-M.; Teo, T.-H.; Lee, W.W.L.; Kam, Y.-W.; Rénia, L.; Ng, L.F.P. An Essential Role of Antibodies in the Control of Chikungunya Virus Infection. *J Immunol* 2013, 190, 6295–6302, doi:10.4049/JIMMUNOL.1300304.
9. Tanabe, I.S.B.; Tanabe, E.L.L.; Santos, E.C.; Martins, W. V; Araújo, I.M.T.C.; Cavalcante, M.C.A.; Lima, A.R. V; Câmara, N.O.S.; Anderson, L.; Yunusov, D.; et al. Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. *Front Cell Infect Microbiol* 2018, 8, 345, doi:10.3389/fcimb.2018.00345.

10. Johnson, B.W.; Russell, B.J.; Goodman, C.H. Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays. *J Infect Dis* 2016, 214, S471, doi:10.1093/INFDIS/JIW274.
11. Brasil. Ministério Da Saúde. Secretaria de Vigilância Em Saúde. Secretaria de Atenção Básica Chikungunya: Manejo Clínico/ Ministério Da Saúde, Secretaria de Vigilância Em Saúde, Secretaria de Atenção Básica.; Brasilia - DF, 2017;
12. Andrew, A.; Navien, T.N.; Yeoh, T.S.; Citartan, M.; Mangantig, E.; Sum, M.S.H.; Ch'ng, E.S.; Tang, T.H. Diagnostic Accuracy of Serological Tests for the Diagnosis of Chikungunya Virus Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2022, 16, doi:10.1371/JOURNAL.PNTD.0010152.
13. Costa, D.M. do N.; Coêlho, M.R.C.D.; Gouveia, P.A. da C.; Bezerra, L.A.; Marques, C.D.L.; Duarte, A.L.B.P.; Valente, L.M.; Magalhães, V. Long-Term Persistence of Serum-Specific Anti-Chikungunya IgM Antibody - A Case Series of Brazilian Patients. *Rev Soc Bras Med Trop* 2021, 54, doi:10.1590/0037-8682-0855-2020.
14. Harris, P.A.; Taylor, R.; Thielke, R.; Payne, J.; Gonzalez, N.; Conde, J.G. Research Electronic Data Capture (REDCap)--a Metadata-Driven Methodology and Workflow Process for Providing Translational Research Informatics Support. *J Biomed Inform* 2009, 42, 377–381, doi: 10.1016/J.JBI.2008.08.010.
15. Ribeiro, G.S.; Kikuti, M.; Tauro, L.B.; Nascimento, L.C.J.; Cardoso, C.W.; Campos, G.S.; Ko, A.I.; Weaver, S.C.; Reis, M.G.; Kitron, U.; et al. Does Immunity after Zika Virus Infection Cross-Protect against Dengue? *Lancet Glob Health* 2018, 6, e140–e141, doi:10.1016/S2214-109X (17)30496-5.
16. Silva, M.M.O.; Tauro, L.B.; Kikuti, M.; Anjos, R.O.; Santos, V.C.; Gonçalves, T.S.F.; Paploski, I.A.D.; Moreira, P.S.S.; Nascimento, L.C.J.; Campos, G.S.; et al. Concomitant Transmission of Dengue, Chikungunya, and Zika Viruses in Brazil: Clinical and Epidemiological Findings from Surveillance for Acute Febrile Illness. *Clin Infect Dis* 2019, 69, 1353–1359, doi:10.1093/CID/CIY1083.
17. Kikuti, M.; Cunha, G.M.; Paploski, I.A.D.; Kasper, A.M.; Silva, M.M.O.; Tavares, A.S.; Cruz, J.S.; Queiroz, T.L.; Rodrigues, M.S.; Santana, P.M.; et al. Spatial Distribution of Dengue in a Brazilian Urban Slum Setting: Role of Socioeconomic Gradient in Disease Risk. *PLoS Negl Trop Dis* 2015, 9, e0003937, doi: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0003937.
18. Santiago, G.A.; Vázquez, J.; Courtney, S.; Matías, K.Y.; Andersen, L.E.; Colón, C.; Butler, A.E.; Roulo, R.; Bowzard, J.; Villanueva, J.M.; et al. Performance of the Triplex Real-Time RT-PCR Assay for Detection of Zika, Dengue, and Chikungunya Viruses. *Nat Commun* 2018, 9, 1–10, doi:10.1038/s41467-018-03772-1.
19. Diniz, C.; Marques, L.; Luzia, A.; Duarte, B.P.; Ranzolin, A.; Tavares Dantas, A.; Cavalcanti, N.G.; Silva, R.; Gonçalves, G.; Ferreira Da Rocha Junior, L.; et al. Recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for the Diagnosis and Treatment

of Chikungunya Fever. Part 2 - Treatment. *Rev Bras Reumatol* 2017, 57, s438–s451, doi: 10.1016/J.RBRE.2017.06.004.

20. de Brito, C.A.A.; Freitas, A.R.R.; Said, R.F.; Falcão, M.B.; da Cunha, R.V.; Siqueira, A.M.; Teixeira, M.G.; Ribeiro, G.S.; de Brito, M.C.M.; Cavalcanti, L.P. de G. Classification of Chikungunya Cases: A Proposal. *Rev Soc Bras Med Trop* 2020, 53, 1–5, doi:10.1590/0037-8682-0529-2020.

21. Chelluboina, S.; Robin, S.; Aswathyraj, S.; Arunkumar, G. Persistence of Antibody Response in Chikungunya. *Virusdisease* 2019, 30, 469–473, doi:10.1007/s13337-019-00534-5.

22. Pierro, A.; Rossini, G.; Gaibani, P.; Finarelli, A.C.; Moro, M.L.; Landini, M.P.; Sambri, V. Persistence of Anti-Chikungunya Virus-Specific Antibodies in a Cohort of Patients Followed From the Acute Phase of Infection after the 2007 Outbreak in Italy. *New Microbes New Infect* 2015, 7, 23–25.

23. Moro, M.L.; Grilli, E.; Corvetta, A.; Silvi, G.; Angelini, R.; Mascella, F.; Miserocchi, F.; Sambo, P.; Finarelli, A.C.; Sambri, V.; et al. Long-Term Chikungunya Infection Clinical Manifestations after an Outbreak in Italy: A Prognostic Cohort Study. *Journal of Infection* 2012, 65, 165–172, doi: 10.1016/J.JINF.2012.04.005.

24. Oliver, M.; Grandadam, M.; Marimoutou, C.; Rogier, C.; Botelho-Nevers, E.; Tolou, H.; Moalic, J.L.; Kraemer, P.; Morillons, M.; Morand, J.J.; et al. Persisting Mixed Cryoglobulinemia in Chikungunya Infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2009, 3, doi: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0000374.

25. Gérardin, P.; Barau, G.; Michault, A.; Bintner, M.; Randrianaivo, H.; Choker, G.; Lenglet, Y.; Touret, Y.; Bouveret, A.; Grivard, P.; et al. Multidisciplinary Prospective Study of Mother-to-Child Chikungunya Virus Infections on the Island of La Réunion. *PLoS Med* 2008, 5, 0413–0423, doi: 10.1371/JOURNAL.PMED.0050060.

26. Guillot, X.; Ribera, A.; Gasque, P. Chikungunya-Induced Arthritis in Reunion Island: A Long-Term Observational Follow-Up Study Showing Frequently Persistent Joint Symptoms, Some Cases of Persistent Chikungunya Immunoglobulin M Positivity, and No Anticyclic Citrullinated Peptide Seroconversion After 13 Years. *J Infect Dis* 2020, 222, 1740–1744, doi:10.1093/INFDIS/JIAA261.

27. Simon, F.; Javelle, E.; Oliver, M.; Leparç-Goffart, I.; Marimoutou, C. Chikungunya Virus Infection. *Curr Infect Dis Rep* 2011, 13, 218–228, doi:10.1007/s11908-011-0180-1.

28. Anjos, R.O.; Portilho, M.M.; Jacob-Nascimento, L.C.; Carvalho, C.X.; Moreira, P.S.S.; Sacramento, G.A.; Nery Junior, N.R.R.; de Oliveira, D.; Cruz, J.S.; Cardoso, C.W.; et al. Dynamics of Chikungunya Virus Transmission in the First Year after Its Introduction in Brazil: A Cohort Study in an Urban Community. *PLoS Negl Trop Dis* 2023, 17, doi:10.1371/JOURNAL.PNTD.0011863.

29. Johnson, B.W.; Goodman, C.H.; Holloway, K.; De Salazar, P.M.; Valadere, A.M.; Drebot, M.A. Evaluation of Commercially Available Chikungunya Virus Immunoglobulin M Detection Assays. *Am J Trop Med Hyg* 2016, 95, 182–192, doi:10.4269/AJTMH.16-0013.
30. 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. *Int J Infect Dis* 2020, 91, 38–43, doi: 10.1016/J.IJID.2019.11.001.

Figure 1 – Frequency and kinetics of anti-CHIKV IgM and IgG detection in samples of patients that developed chronic arthralgia after Chikungunya virus infection according to days post symptoms onset at the time of sample collection.

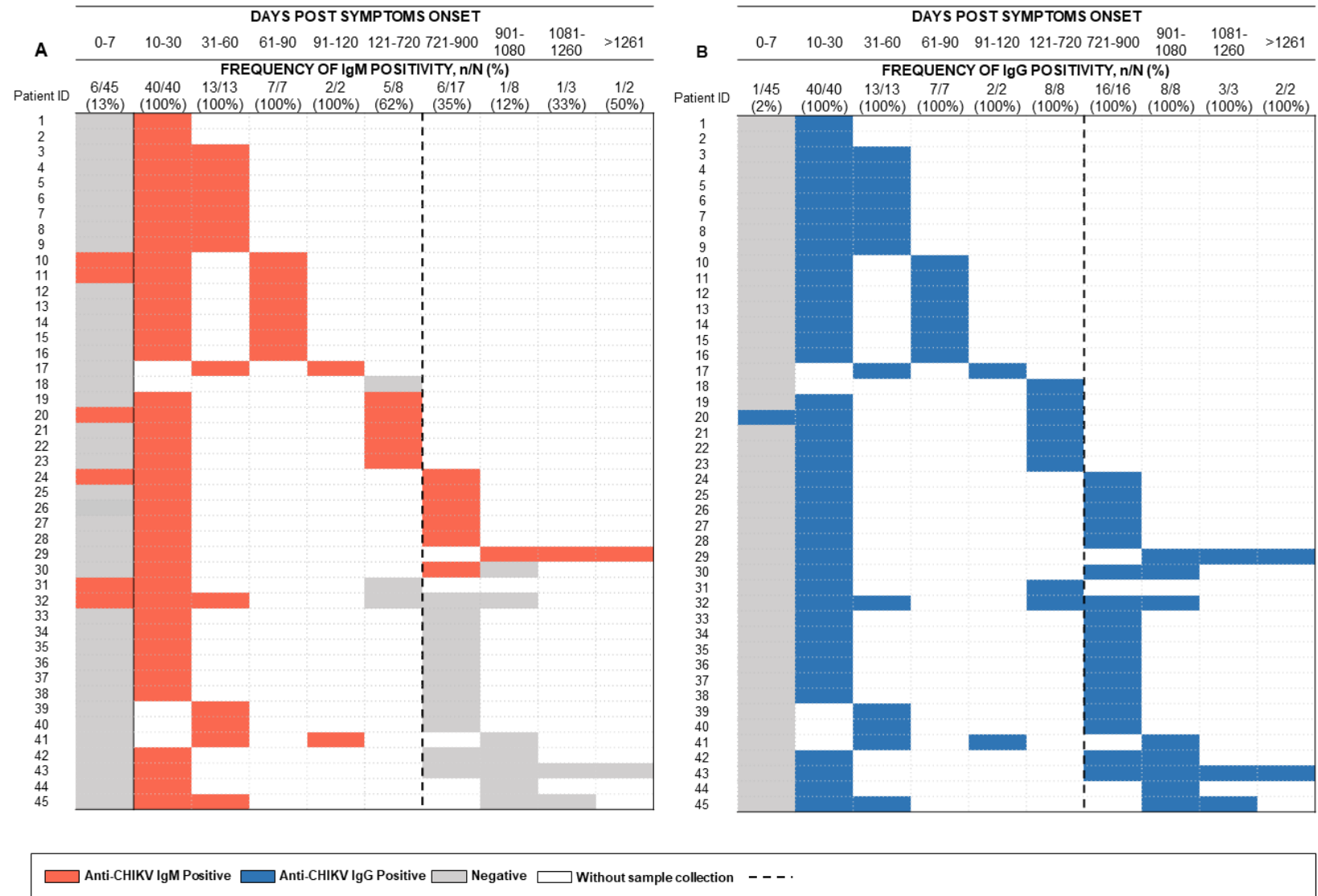


Table 1. Demographic, clinical and laboratory characteristics of 45 patients with laboratory-confirmed chikungunya followed up from acute illness to chronic disease

Characteristics	Days post symptoms onset (DPSO) at the time of the visit									
	0-7 (N=45)	10-30 (N=40)	31-60 (N=13)	61-90 (N=7)	91-120 (N=2)	121-720 (N=8)	721-900 (N=17)	901-1080 (N=8)	1,081-1,260 (N=3)	>1,260 (N=2)
Demographics and clinical	% (n) or median (interquartile range)									
Sex (Female)	33 (73)	30 (75)	11 (84)	4 (57)	1 (50)	7 (87)	12 (70)	6 (75)	2 (66)	1 (50)
Age	44 (35-56)	45 (35-56)	37 (30-49)	56 (47-52)	38 (33-44)	54 (40-68)	44 (33-52)	40 (33-48)	37 (21-55)	44 (33-56)
DPSO	1 (1.5-3)	15 (13-20)	36 (37-44)	74 (67-78)	102 (96-107)	166 (147-271)	848 (806-860)	1008 (959-1,022)	1,120 (1,120-1,172.5)	1,301.5 (1,294-1,308.8)
Arthralgia	45 (100)	35 (94) ^a	12 (92)	7 (100)	2 (100)	7 (87)	17 (100)	8 (100)	3 (100)	2 (100)
Myalgia	45 (100)	0 (0) ^b	8 (80) ^d	6 (85)	0 (0)	4 (50)	13 (76)	5 (62)	2 (66)	1 (50)
Joint edema	31 (68)	27 (75) ^c	12 (100) ^e	7 (100)	2 (100)	5 (62)	12 (75)	7 (87)	2 (66)	2 (100)
Laboratory										
RT-qPCR CHIKV positive	43 (95)	5 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Cycle Threshold	22.82 (20.0-28.4)	36.75 (35.6-37.9)	-	-	-	-	-	-	-	-
ELISA IgM positive	6 (13)	40 (100)	13 (100)	7 (100)	2 (100)	5 (62)	6 (35)	1 (12)	1 (33)	1 (50)
Optical Density	0.10 (0.07-0.13)	2.73 (2.51-2.9)	2.40 (2.03-2.59)	2.20 (1.04-2.57)	0.33 (0.33-0.34)	0.35 (0.21-0.56)	0.19 (0.13-0.27)	0.14 (0.13-0.19)	0.10 (0.08-0.38)	0.21 (0.11-0.31)
Sample/Calibrator Ratio ^{1,2}	0.23 (0.16-0.48)	10.54 (9.61-14.12)	11.22 (9.21-14.15)	12.26 (5.78-4.26)	1.85 (1.80-1.91)	2.28 (0.85-3.74)	0.77 (0.66-1.50)	0.54 (0.48-0.68)	0.33 (0.27-1.26)	1.04 (0.35-1.72)
ELISA IgG positive	1 (2)	40 (100)	13 (100)	7 (100)	2 (100)	8 (100)	17 (100)	8 (100)	3 (100)	2 (100)
Optical Density	0.1 (0.07-0.13)	0.998 (0.84-1.12)	1.36 (1.17- 1.42)	1.58 (1.47-1.63)	1.56 (1.52-1.6)	1.51 (1.46-1.54)	1.48 (1.39-1.53)	1.55 (1.50-1.6)	1.6 (1.55-1.76)	1.39 (1.34-1.43)
Sample/Calibrator Ratio ^{1,3}	0.19 (0.15-0.3)	2.33 (1.98-2.64)	3.01 (2.78-3.13)	3.5 (3.25-3.60)	3.44 (3.36-3.53)	3.36 (3.28-3.43)	3.42 (3.30-3.84)	3.52 (2.72-3.61)	2.75 (2.66-3.03)	2.55 (2.38-3.92)

^aData available for 35 patient ; ^bData available for 2 patient; ^c Data available for 27 patient; ^dData available for 8 patients; ^eData available for 12 patients; ^fSample/Cut-off ratio is calculated from the ratio of the optical density obtained with the test sample divided by the calculated cut-off value; ^gResults based on sample/cut-off optical density ratio for IgM ELISA are interpreted as follows: <0.9 = Negative; >1.1=Positive; ≥0.9 and ≤1.1= Indeterminate; ^hResults based on sample/cut-off optical density ratio for IgG ELISA are interpreted as follows: <0.8 = Negative; ≥1.1=Positive; ≥0.8 and <1.1= Indeterminate.

Table 2. Acute-phase clinical and laboratory features among patients followed up >720 days post symptoms onset (DPSO) according to anti-CHIKV IgM persistence status.

Characteristics	Anti-CHIKV IgM persistence >720 days (n=7)	Anti-CHIKV IgM persistence ≤720 days (n=14)	Without sample collection >720 days (n=24)	Total (N=45)
n (%) or median (interquartile range)				
Demographic				
Sex (F)	5 (71)	9 (64)	19 (79)	33 (73)
Age	52 (37-56)	43 (32-47)	44 (31-67)	44 (35-56)
Acute chikungunya clinical manifestations				
Fever	7 (100)	13 (93)	24 (100)	44 (97)
Arthralgia	7 (100)	14 (100)	24 (100)	45 (100)
Myalgia	7 (100)	14 (100)	24 (100)	45 (100)
Articular Edema ^a	6 (85)	9 (64)	16 (66)	31 (68)
Rash	2 (28)	6 (42)	10 (43) ^b	18 (40)
Pruritus	2 (28)	5 (33)	10 (41)	17 (37)
Abdominal pain	5 (71)	9 (64)	7 (29)	21 (46)
Vomit	1 (14)	2 (14)	8 (33)	11 (24)
Prior medical conditions				
Pre-existing joint pain	3 (42)	6 (42)	7 (35)	16 (35)
Hypertension	2 (28)	4 (28)	8 (33)	14 (31)
Diabetes	1 (14)	2 (14)	1 (4)	4 (8)
Laboratory results, 0-7 DPSO				
Anti-CHIKV IgM ^{3,4}	1 (14)	1 (7)	4 (16)	6 (13)
Sample OD/calibrator ratio	0.27 (0.16-0.44)	0.20 (0.15-0.13)	0.21 (0.15-0.55)	0.23 (0.16-0.48)
Anti-CHIKV IgG ^{3,5}	0 (0)	0 (0)	1(1)	1 (2)
Sample OD/calibrator ratio	0.18 (0.18-0.3)	0.20 (0.16-0.31)	0.19 (0.14-0.31)	0.19 (0.15-0.30)
RT-qPCR CHIKV	5 (71)	14 (100)	24 (100)	43 (95)
Cycle threshold	20.68 (20.4-22.82)	22.49 (20.05-27.66)	24.97 (20.43-33.23)	22.96 (20.06-30.51)
Laboratory results, 10-30 DPSO				
Anti-CHIKV IgM ^{3,4}	7 (100)	11 (100)	22 (100)	40 (100)
Sample OD/calibrator ratio	11.63 (10.12-16.43)	13.40 (9.71-13.88)	10.19 (9.44-15.18)	10.71 (9.61-14.52)
Anti-CHIKV IgG ^{3,5}	7 (100)	11 (100)	22 (100)	40 (100)
Sample OD/calibrator ratio	2.24 (2.11-3.09)	2.34 (1.95-2.49)	2.35 (1.98-2.64)	2.33 (1.98-2.64)
RT-qPCR CHIKV	0 (0)	2 (18)	0 (0)	2 (5)
Cycle threshold	-	36.75 (35.6-37.9)	-	36.75 (35.6-37.9)

^a This variable refers to edema in at least one of the following joints: fingers, toes, elbows, wrists, knees and ankles;

^b Data available for 23 patient; ^c Sample/calibrator ratio is calculated from the ratio of the optical density; obtained with the test sample divided by the calculated calibrator value. ^d Results based on sample/calibrator ratio for IgM ELISA are interpreted as follows: <0.9 = Negative; >1.1=Positive; ≥0.9 and ≤1.1= Indeterminate. ^e Results based on sample/calibrator ratio for IgG ELISA are interpreted as follows: <0.8 = Negative; ≥1.1=Positive; ≥0.8 and <1.1= Indeterminate.

5.2 Manuscrito 2 - Objetivos 2, 3 e 4

Objetivo 2 - Investigar a carga viral no soro de pacientes com confirmação laboratorial de infecção por CHIKV;

Objetivo 3 - Descrever o perfil e cinética de biomarcadores anti-inflamatórios, pró-inflamatórios e regulatórios (quimiocinas e citocinas e fatores de crescimento) no soro de pacientes positivos por CHIKV;

Objetivo 4 - Avaliar perfis de risco para o desenvolvimento de artralgia crônica considerando os níveis de anticorpos, biomarcadores e características clínicas e sociodemográficas dos pacientes.

5.2.1 Manuscrito 2

Artigo a ser submetido em *Frontiers in Immunology/ Emergin Infectious Diseases -CDC/ American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.

Exploring Risk Factors and Biomarkers Associated with Chronic Arthralgia Post-Chikungunya Virus Infection: A Comprehensive Analysis

Leile Camila Jacob-Nascimento¹, Moyra M. Portilho¹, Emilia Belitardo¹, Moises S. Sousa¹, Stephane Tosta¹, Rosângela O. Anjos¹, Patricia S. S. Moreira¹, Viviane Machicado², Adriane Paz², Lorena Gomes¹, Mittermayer B. Santiago², Mitermayer G. Reis^{1,3,4}, Guilherme S. Ribeiro^{1,3*}

5.2.2 Apresentação

Este artigo contempla a investigação proposta no segundo, terceiro e quarto objetivo específico da presente tese. Teve como objetivo principal investigar diversos fatores de risco para o desenvolvimento de artralgia crônica após a infecção pelo CHIKV e de avaliar se características clínicas e biomarcadores de fase aguda tem relação com a persistência da dor nestes pacientes.

Exploring Risk Factors and Biomarkers Associated with Chronic Arthralgia Post-Chikungunya Virus Infection: A Comprehensive Analysis

Leile Camila Jacob-Nascimento¹, Moyra M. Portilho¹, Emilia Belitardo¹, Moises S. Sousa¹, Stephane Tosta¹, Rosângela O. Anjos¹, Patricia S. S. Moreira¹, Viviane Machicado², Adriane Paz², Lorena Gomes¹, Mittermayer B. Santiago², Mittermayer G. Reis^{1,3,4}, Guilherme S. Ribeiro^{1,3*}

¹Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil; ² Bahiana School of Medicine and Public Health, Salvador, Brazil; ³ Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil; ⁴ Yale University, New Haven, USA;

Abstract

Since its reemergence in 2013, the chikungunya virus (CHIKV) has caused multiple outbreaks worldwide, primarily affecting Latin America and Brazil. The most common symptoms in infected individuals include fever, intense arthralgia, joint edema, myalgia, and headache. Arthralgia may persist for months to years. The reasons why some individuals develop chronic arthralgia following CHIKV infection are not yet fully understood. This study proposes evaluation of clinical, immunological, and viral factors in 71 patients with a positive chikungunya diagnosis by RT-qPCR, monitored in a cohort study to gather information on the outcome of either arthralgia chronification or symptom resolution, along with biological sample collection. All patients were evaluated during visits conducted at 0–7 and 10–45 days post-symptom onset (DPSO). For a subgroup (n=25), at least one additional visit and sample collection was conducted >45 days post-symptom onset. Clinical and sociodemographic characteristics, clinical suspicion, and medication use were analyzed, while samples from these patients were evaluated for anti-CHIKV IgM and IgG, as well as for levels of 19 cytokines, chemokines, and growth factors (GCSF, GMCSF, IFN γ , IFN α 2, IL-10, IL-12p40, IL-17E, IL-18, IL-1 β , IL-2, IL-22, IL-4, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, MIG, TNF α and VEGFA) in addition to CHIKV viral load and whole genome sequencing. The majority of patients were female, 67% (48/71), with a median age of 40 years. Of the 71 patients followed, 59% (42/71) developed chronic arthralgia. The frequency of edema and age were significantly higher ($p < 0.01$) among those who reported arthralgia >90 days. Paired samples revealed seroconversion of IgM and IgG antibodies in 96% (70/71) and 100% of patients, respectively. Approximately 30% of individuals that developed chronic arthralgia exhibited persistent IgM antibodies >2 years after symptoms onset. Levels of GMCSF and IP-10/CXCL10 in samples collected at 0–7 DPSO and 10–45 DPSO, respectively, were higher in the group that developed chronic arthralgia compared to those who did not. Viral load was not associated with the development of chronic arthralgia, and mutations found in viral genomes were not clinically significant. Intrinsic characteristics of the individual and immune response appear to play a more important role than viral factors in the progression to chronic arthralgia. Edema and age were associated with chronic arthralgia development, and opioid use was more frequent in this group, suggesting that these patients experience more intense symptoms and may require more targeted pain management.

Introduction

The Chikungunya virus (CHIKV) is an RNA single strain arbovirus from the *Alphavirus* genus, *Togaviridae* family first discovered in 1952 in Tanzania, Africa (1,2). This arbovirus is primarily transmitted by mosquitoes of the *Aedes* genus, mainly *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (3). CHIKV has three described genotypes: West African, East/Central/South African (ECSA), and

Asian, all of which can cause disease in humans (6). The main symptoms of CHIKV infection include fever, arthralgia, joint swelling, headache, and myalgia. Furthermore, around 51% of patients infected with CHIKV may develop chronic joint pain (>90 days after the onset of symptoms [DPSO]), which can last for months to years (8). Chronic arthralgia caused by CHIKV is debilitating and can affect not only the physical health but also the mental well-being of affected individuals, leading to movement limitations, inability to work, impact on family income, and even depression and anxiety. These issues significantly affect the quality of life of patients and generate additional costs for healthcare systems. (CARDONA-OSPINA et al., 2015; HONÓRIO et al., 2015; LIMA MARTINS et al., 2016).

Since the first outbreaks described in Africa, CHIKV has spread to Asia, Europe, and the Americas between 2004-2007, eventually reaching the Caribbean and Brazil in 2013-2014 (9). The first case of autochthonous Chikungunya in Brazil was reported in 2014 in Oiapoque, Amapá, and Feira de Santana, Bahia (10,11). These initial cases marked the beginning of a widespread transmission across Brazil, leading to significant public health challenges. Following these outbreaks, the virus rapidly spread to other regions of the country, with thousands of cases being reported in the following years. Since its introduction, CHIKV has caused outbreaks in the state of Bahia in 2016 and 2020 and in the city of Salvador, particularly, during the years 2019 and 2020 (SESAB, 2020; CIEVS SSA, 2020)

Despite more than a decade having passed since the emergence of CHIKV in Brazil and globally, numerous aspects of its transmission mechanisms, clinical manifestations, and immunopathogenesis remain unclear. This study aims to conduct a comprehensive multifactorial assessment of patients diagnosed with Chikungunya, who were monitored over time to determine the factors related to chronic arthralgia or symptom resolution. By evaluating a range of factors, including clinical symptoms, sociodemographic data, immunological responses, disease progression biomarkers, CHIKV viral load and genetic characteristics, this research seeks to provide an integrated understanding of the potential immunopathogenic mechanisms underlying chronic arthralgia following CHIKV infection.

Materials and Methods

Study Population

Our research team has been conducting a surveillance study for acute febrile illnesses at a Health Emergency Unit (HEU) in the Pau da Lima neighborhood of Salvador, Bahia, Brazil since 2016. There is a dedicated infrastructure room for clinical-epidemiological studies of

acute febrile illnesses that was established on-site. Patients over six months old at HEU who presented with rash and/or fever (self-reported or measured, exceeding 37.8°C) within 7 days prior to attending the unit were invited to participate in the study. All study procedures were performed after obtaining verbal and written consent (Free and Informed Consent Form for ≥ 18 and Free and Informed Assent Form for < 18 years old). Samples, clinical and epidemiological data from patients included in the surveillance study were collected at two time-points: A) during enrollment, between 0-7 days after symptom onset; B) after the patient's return to the HEU or during a home visit, between 10-45 days after symptom onset. Additionally, when available, patient record review was screened. All samples were transported to the Pathology and Molecular Biology Laboratory (LPBM) at Oswaldo Cruz Foundation – Bahia processed, aliquoted, and stored at -80°C and -20°C until the time of laboratory tests.

Arboviruses Laboratory Diagnosis

Samples from all patients recruited in the surveillance study underwent laboratory diagnosis for the arboviruses dengue (DENV), Zika (ZIKV), and chikungunya (CHIKV) by molecular biology (samples stored at -80°C) and serology (samples stored at -20°C).

Molecular biology

RNA detection was performed using 200µL of serum stored at -80°C with the Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega, Madison, United States), or QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany), or Quick-DNA/RNA Viral MagBead R2140 (Zymo Research, Tustin, CA, USA) with the KingFisher Sample Purification Systems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) according to the manufacturer's instructions. The extracted RNA was utilized for molecular diagnosis of CHIKV, ZIKV and DENV using the Trioplex (RT-qPCR) protocol from the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) using polymerase enzyme from (1).

Serology

All serum samples of patients recruited in the surveillance study were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of anti-DENV IgM antibodies using the Dengue IgM Capture ELISA kit (Panbio Diagnostics, Brisbane, Australia), anti-CHIKV IgM antibodies with the CHIKjj Detect™ IgM ELISA kit (InBios International, Seattle, United States), and Dengue Early ELISA NS1 assay (Panbio Diagnostics, Brisbane, Australia) for detection of DENV NS1 antigen. All assays were performed following the manufacturers'

instructions using the Sunrise absorbance reader and Magellan™ software (Tecan, Männedorf, Switzerland).

Chikungunya Patients Follow-up

To obtain information on the duration of arthralgia, patients with laboratory-confirmed CHIKV infection were followed up by telephone contact. During this telephone contact, it was verified whether the patient still had any complaints related to the disease that led them to HEU. Contacted patients who still had complaints were invited for evaluation at the rheumatology outpatient clinic of the Professor Edgard Santos University Hospital, Federal University of Bahia (HUPES-UFBA), where specialized clinical care with a rheumatologist, interview, and new blood sample collection were conducted. Samples collected at the rheumatology outpatient clinic were transported to LPBM, aliquoted, and stored in an ultra-freezer at -80°C until testing.

Participants selection and inclusion criteria for the study

For this study, patients who met the following criteria were selected: (1) were recruited in the surveillance study for febrile and exanthematous diseases until the year 2020; (2) had laboratory-confirmed CHIKV infection by RT-qPCR; (3) had at least two blood samples collected during the surveillance study; and (4) had information on arthralgia duration obtained after 90 days of symptom onset through telephone contact or outpatient care. This subgroup of patients' samples underwent assays to evaluate anti-CHIKV IgM and IgG antibodies, cytokines, chemokines, growth factors, CHIKV viral load levels and whole genome sequencing assays from serum samples.

IgM and IgG ELISA

All samples collected from selected patients during the study were additionally tested for detection and quantification of anti-IgM (as previously described) and anti-CHIKV IgG antibodies using the Anti-CHIKV IgG Kit (Euroimmun, Lubeck, Germany) following the manufacturers' instructions and using the Sunrise absorbance reader and Magellan™ software (Tecan, Männedorf, Switzerland).

Cytokines, Chemokines, and Growth Factors Measurement Assay

We evaluate serum levels of chemokines, cytokines, and growth factors using samples stored at -80°C and performed the MILLIPLEX® MAP Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel - HCYTA-60K-10 kit (Merk Millipore, Germany) using Luminex® 200™ equipment

were used and analyzed with xPONENT® software version 4.2. This panel included 19 analytes (GCSF, GMCSF, IFN γ , IFN α 2, IL-10, IL-12p40, IL-17E, IL-18, IL-1 β , IL-2, IL-22, IL-4, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, MIG, TNF α , VEGFA), and results were given in pg/mL.

CHIKV Viral Load Quantification

The CHIKV viral load in serum samples from study patients were determined by RT-qPCR and compared with a standard curve from a 1:10 dilution of a CHIKV culture, genotype ECSA obtained in collaboration with Instituto Evandro Chagas. This CHIKV culture were quantified by the commercial kit Amplirun® Chikungunya control (Viracell, Granada, Spain). The standard curve for quantification of the CHIKV culture was performed in triplicate with 5 points in the serial dilution (20,000, 2000, 200, 20, and 2 copies) in each plate. Assay validation parameters were $R^2 > 98\%$ and Efficiency 80-110% (slope between -3.83 to -3.27). The RT-qPCR protocol used was the same as previously described, except that for this assay, only CHIKV primers were used. Relative quantification analysis was performed using the 7500 Real-Time PCR equipment (Applied Biosystems Inc, Waltham, United States).

CHIKV Whole-genome Sequencing (WGS) and Phylogenetic Analysis

Libraries were prepared using the COVIDSeq Test (Illumina, Cat. No. 20043675 and 20043137) with ChikAsianECSA V1 primer set. Fragment length distribution was assessed using the Agilent Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, Cat. No. 5067-4626) on the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Cat. No. G2939BA). Concentration was assessed using Qubit 1X dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. Q33230 or Q33231) on the Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. Q33216). The library pool was denatured and diluted to a final loading concentration of 10 pM, then loaded into the 300-cycle MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina, Cat. No. MS-102-2002). Paired-end sequencing was performed using Illumina MiSeq (Illumina, Cat. No. SY-410-1003) with 150bp length. All protocols followed the manufacturer's instructions; however, some modifications were incorporated during library preparation, as detailed at (14). The entire workflow is available at (<https://github.com/khourious/vigeas>). To compose a dataset for phylogenetic analysis, we retrieved full or near full-length genomes of CHIKV from Brazil, along with their collection dates. The sequences were obtained from the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center at <https://www.bv-brc.org/>. The genotypes of the retrieved genomes were determined using the Chikungunya Virus Typing Tool available at <https://www.genomedetective.com/app/typingtool/chikungunya/>. Only genomes assigned to

the ECSA genotype were retained for further analysis. The alignment of the dataset was performed using MAFFT v7.455, followed by manual editing with AliView v1.26. The best-fitting model was determined using ModelFinder, which is implemented in IQ-TREE. Phylogenetic inference was conducted with the maximum likelihood criterion in IQ-TREE, applying the general time reversible model with the approximate likelihood-ratio test based on the bootstrap and the Shimodaira–Hasegawa-like procedure with 1000 replicates. To exclude sequences identified as outliers, we used the regression of root-to-tip genetic distances against sample dates, conducted with TempEst v1.5.3. The trees were visualized using R with the ggtree package. Genetic recombination was checked with RDP4 (15) tool. Additionally, the Simmonds Association Index (16) implemented in the SES tool was used to detect associations between phylogenetic clustering and group assignments (Chronic vs. Non-chronic).

Data Analysis and Ethical Aspects

All clinical-epidemiological data as well as laboratory results from patients were stored in the REDCap (Research Electronic Data Capture) digital database. Statistical analyses were performed using STATA version 12 and/or Prism Version 8 software. Clinical characterization analyses were performed according to the number of DPSO present at the time of care dates, and then the frequency (%; n/N) or median and interquartile range of clinical features and laboratory test results. Comparisons between groups for categorical data were performed using Fisher Exact Test. Continuous data such as age, DPSO, serum biomarkers levels, viral load, and antibody levels were compared between different patients' samples groups using Mann-Whitney (2 groups) or Kruskal-Wallis (>2 groups) and between paired samples groups of patients using Wilcoxon Signed-Rank Test. Additional comparisons were made using multivariate Poisson backward regression to evaluate different variables to determine profiles of patients with persistent arthralgia. Results were expressed as a 95% confidence interval (CI 95%) and risk ratio (RR) and/or statistical significance of the variable in the multivariable model for the development of persistent arthralgia (> 3 months). The models were constructed by including all variables with a p-value <0.20 in the bivariate analysis, along with days of symptoms, sex, and age, which were added to both models as key variables.

After this initial run, the backward stepwise regression method was applied. In this process, variables with a p-value >0.05 were systematically removed, starting with the variable with the highest p-value. The model was re-estimated after each removal until only variables with a p-value <0.05 remained, along with the key variables (days of symptoms, sex, and age), which

were retained in the model regardless of their p-value due to their theoretical importance. Significance was determined if $P < 0.05$. Individuals with missing information for any variable were excluded from the analysis.

This project was approved by the Institutional Review Board of the Gonçalo Moniz Institute – Oswaldo Cruz Foundation Bahia, entitled "Emerging Arboviruses: A Clinical, Epidemiological, and Entomological Study," under No. 1,642,535 on 07/20/2016 (CAAE: 55904616.4.0000.0040).

Results

Between September 2016 and March 2020, a total of 2,645 participants were recruited for the surveillance study, of whom 382 (14%) tested positive for CHIKV by RT-qPCR detection. We tried to contact 290 (76%) of chikungunya patients via telephone and successfully obtained information on the duration of arthralgia from 80 (27%) of them. Ultimately, 71 participants, who had at least two paired surveillance samples and provided data on arthralgia duration, were selected for the present study. All participants selected for the study were identified during surveillance between May 2017 and March 2020. Additionally, a subgroup of 25 of these selected participants received rheumatological medical care at HUPES-UFBA, with at least one blood sample collection, and 24/25 (96%) had sample collected >90 DPSO.

Among the 71 patients selected in the study, 59% (42/71) developed chronic arthralgia. In the acute phase of the disease, patients with arthralgia lasting >90 DPSO had a median age of 42 years (IQR 34-52), significantly higher ($p < 0.01$) compared to those without arthralgia beyond 90 DPSO, who had a median age of 37 years (IQR 26-40). No differences were found regarding race as most patients in both groups (>80%) self-identified as Black or Brown. Of those who developed chronic arthralgia, 76% (32/42) were female, whereas 55% (16/29) of the non-chronic group were female. Patients with arthralgia lasting more than 90 days also exhibited a significantly ($p < 0.01$) higher frequency of swollen joints (75%, 31/42), particularly ankles and knees during the first 7 days of disease, compared to 24% (10/29) in the non-chronic group. Although no other statistically significant differences were observed regarding the other 0-7 DPSO-assessed symptoms, arthralgia, myalgia, retro-orbital pain, and rash were more frequently reported (97%, 90%, 71%, and 40%, respectively) in patients who developed chronic arthralgia versus those who recovered (86%, 86%, 62%, and 24%). Overall patients frequently reported fever, arthralgia, and myalgia, occurring in over 90% of cases, followed by headache (89%), prostration (68%), edema (58%), and rash (34%) (Table 1).

No significant differences between groups were found in Ct values obtained from RT-qPCR, CHIKV viral load or the presence of specific IgM and IgG antibodies against CHIKV in the acute phase of the disease. Clinically, subsequent follow-up visits were characterized by the absence of fever and the persistence of arthralgia and edema. Regarding laboratory results, all participants tested positive for CHIKV by RT-qPCR in the 0-7 DPSO sample, as per the selection criteria, with a median Ct 22, and two samples collected 10-45 DPSO tested positive by RT-qPCR (median Ct 36.75), all from patients from the group that developed chronic arthralgia. Regarding anti-CHIKV antibodies detection, 14% (10/71) of participants showed IgM antibodies in the first collected sample and 3% (2/71) of patients tested positive for IgG. By 10-45 DPSO, 98% (70/71) of patients exhibited detectable IgM anti-CHIKV and 100% tested IgG positive (Table 1).

Table 1. Demographic, clinical, and laboratory characteristics of acute-phase patients with chikungunya virus infection, categorized by arthralgia status after 3 months of symptoms onset, attended at a healthcare facility in Salvador, Bahia, Brazil (2017-2020)

	Chronic (n=42)	Non- chronic (n=29)	Total (n=71)	P value ¹
	n (%) or median (interquartile range)			
Demographic Features				
Sex (F)	32 (76)	16 (55)	48 (67)	0.07
Age	42 (34 - 52)	37 (26-40)	40 (31-47)	<0.01
<15	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.04
15-29	4 (10)	10 (34)	14 (20)	
30-44	22 (52)	14 (48)	36 (50)	
45-59	11 (26)	3 (10)	14 (20)	
≥60	5 (12)	2 (7)	7 (10)	
Race/ethnicity				0.49
White	2 (5)	3 (10)	5 (7)	
Black/Brown	35 (83)	23 (80)	58 (82)	
Asian	3 (7)	3 (10)	6 (8)	
Indigenous	2 (5)	0 (0)	2 (3)	
Clinical Features				
Days post symptoms onset (DPSO)	1 (1-3)	1 (1-2)	1 (1-3)	0.44
Fever	41 (97)	29 (100)	70 (98)	1.00
Myalgia	41 (97)	29 (100)	40 (98)	1.00
Arthralgia	41 (97)	25 (86)	66 (93)	0.15
Ankles	40 (95)	23 (79)	63 (89)	0.05
Wrists ²	41 (97)	24 (85)	65 (93)	0.14
Knees	40 (95)	25 (86)	65 (92)	0.21
Fingers and/or toes	41 (97)	26 (89)	67 (94)	0.29
Headache	38 (90)	25 (86)	63 (89)	0.70
Prostration	38 (90)	27 (93)	65 (92)	1.00
Retro orbital pain	30 (71)	18 (62)	48 (68)	0.44
Joint edema	31 (75)	10 (24)	41 (58)	<0.01
Ankles ²	19 (45)	3 (10)	22 (31)	<0.01
Wrists ²	21 (50)	7 (25)	28 (40)	0.04
Knees ³	15 (36)	2 (7)	14 (25)	<0.01
Fingers and/or toes ²	22 (52)	7 (25)	29 (41)	0.02
Abdominal pain	20 (47)	15 (51)	35 (49)	0.46

Rash	17 (40)	7 (24)	24 (34)	0.20
Pruritus	11 (26)	9 (31)	20 (28)	0.78
Diarrhea	8 (19)	6 (20)	14 (20)	1.00
Vomit	8 (19)	4 (13)	12 (17)	0.78
Laboratory results 0-7 DPSO				
IgM anti-CHIKV	7 (17)	3 (10)	10 (14)	0.51
IgG anti-CHIKV	1 (2)	1 (3)	2 (3)	0.78
RT-qPCR CHIKV	42 (100)	29 (100)	71 (100)	-
Cycle Threshold	22 (20-27)	24 (21-26)	22 (20-27)	0.77
Viral load (copies/uL)	8x10 ⁴ (5x10 ³ -3x10 ⁵)	6x10 ⁴ (8x10 ³ -4x10 ⁵)	7x10 ⁴ (5x10 ³ -3x10 ⁵)	0.96
Laboratory results 10-45 DPSO				
IgM anti-CHIKV	42 (100)	28 (96)	70 (98)	0.42
IgG anti-CHIKV	42 (100)	29 (100)	71 (100)	-
RT-qPCR CHIKV	2 (4)	0 (0)	2 (3)	0.50
Cycle Threshold	36.75 (35.6-37.9)	-	36.75 (35.6-37.9)	-
Viral load (copies/uL)	6 (3-9)	-	6 (3-9)	-

¹Two-tailed Fisher Exact test for 2 categorical variables, Kruskal-Wallis test for >2 categories variables and Mann-Whitney test for continuous variables; ²Data available for 70 patients; ³Data available for 69 patients

Most patients that developed chronic arthralgia (72%) had presumptive diagnosis of arboviral infection at the time of recruitment, compared to 48% in the non-chronic group, with a trend approaching statistical significance ($p=0.07$). Dengue was suspected by clinicians in 15% of chronic arthralgia patients, but only 3% of the non-chronic group, while Zika was suspected in 2% of the chronic group, with no suspicion in the non-chronic group. Clinical suspicion of Chikungunya was significantly more frequent in the chronic arthralgia group (20%) compared to no suspected cases in the non-chronic group ($p=0.01$). When considering the suspicion of at least one of the three arboviruses, 57% of patients in the chronic group had suspected arboviral infections, compared to 42% of those who recovered after 90 DPSO. Other diagnoses, such as non-specified viral infections, urinary tract infections, respiratory infections, and allergic skin reactions, were reported in small percentages in both groups, with no significant differences. Analgesics were administered at similar rates in both groups, with 32% of chronic patients and 29% of non-chronic patients receiving these medications. Anti-inflammatory drugs were used more frequently in the non-chronic group (55%) than in the chronic group (37%), but this difference was not statistically significant. NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) were prescribed to a small proportion of patients in both groups (5% chronic vs. 11% non-chronic, $p=0.38$), while SAIDs (steroidal anti-inflammatory drugs) were given at similar and higher rates, with 40% in the chronic group and 44% in the non-chronic group. Opioids were significantly administered for the patients in the chronic group (22%) compared to the non-chronic group (3%) ($p=0.04$) (Table 2).

Table 2. Presumptive diagnosis and drug administration data obtained through medical record review at emergency facility during the early acute phase (0-7 days post-symptom onset) from patients with laboratory-confirmed chikungunya virus infection via RT-qPCR, according to arthralgia status 3 after months of symptoms onset, in Salvador, Bahia, Brazil (2017-2020).

	Chronic (n=40)	Non-chronic (n=27)	Total (n=67)	P value ¹
	n (%) or median (interquartile range)			
PRESUMPTIVE DIAGNOSIS²				
Any arboviral infection	29 (72)	13 (48)	42 (62)	0.07
Dengue	6 (15)	1 (3)	7 (10)	0.22
Zika	1 (2)	0 (0)	1 (1)	1.00
Chikungunya	8 (20)	0 (0)	8 (12)	0.01
Non-specified arboviral infection	16 (57)	12 (42)	28 (42)	0.80
Non-specified viral infection	1 (2)	4 (15)	5 (7)	0.14
Urinary Tract Infection	1 (2)	2 (7)	3 (4)	0.56
Upper Respiratory Tract Infection	1 (2)	0 (0)	1 (1)	1.00
Tonsillitis or Pharyngitis	0 (0)	2 (7)	2 (3)	0.15
Adenoviral Infection	0 (0)	1 (3)	1 (1)	0.40
Allergic Skin Reaction	0 (0)	2 (7)	2 (3)	0.15
Hyperglycemia	1 (2)	0 (0)	1 (1)	1.00
Without presumptive diagnosis	10 (25)	9 (33)	19 (28)	0.58
DRUGS ADMINISTERED DURING CLINICAL CARE				
Analgesics	13 (32)	8 (29)	21 (31)	1.00
Anti-inflammatory drugs	15 (37)	15 (55)	30 (44)	0.21
NSAIDs ³	2 (5)	3 (11)	5 (7)	0.38
SAIDs ⁴	16 (40)	12 (44)	28 (42)	0.80
Opioids ⁵	9 (22)	1 (3)	10 (14)	0.04

¹ Two-tailed Fisher Exact test for categorical variables and Mann-Whitney test for continuous variables

² Physicians may indicate more than one clinical suspicion in the medical record

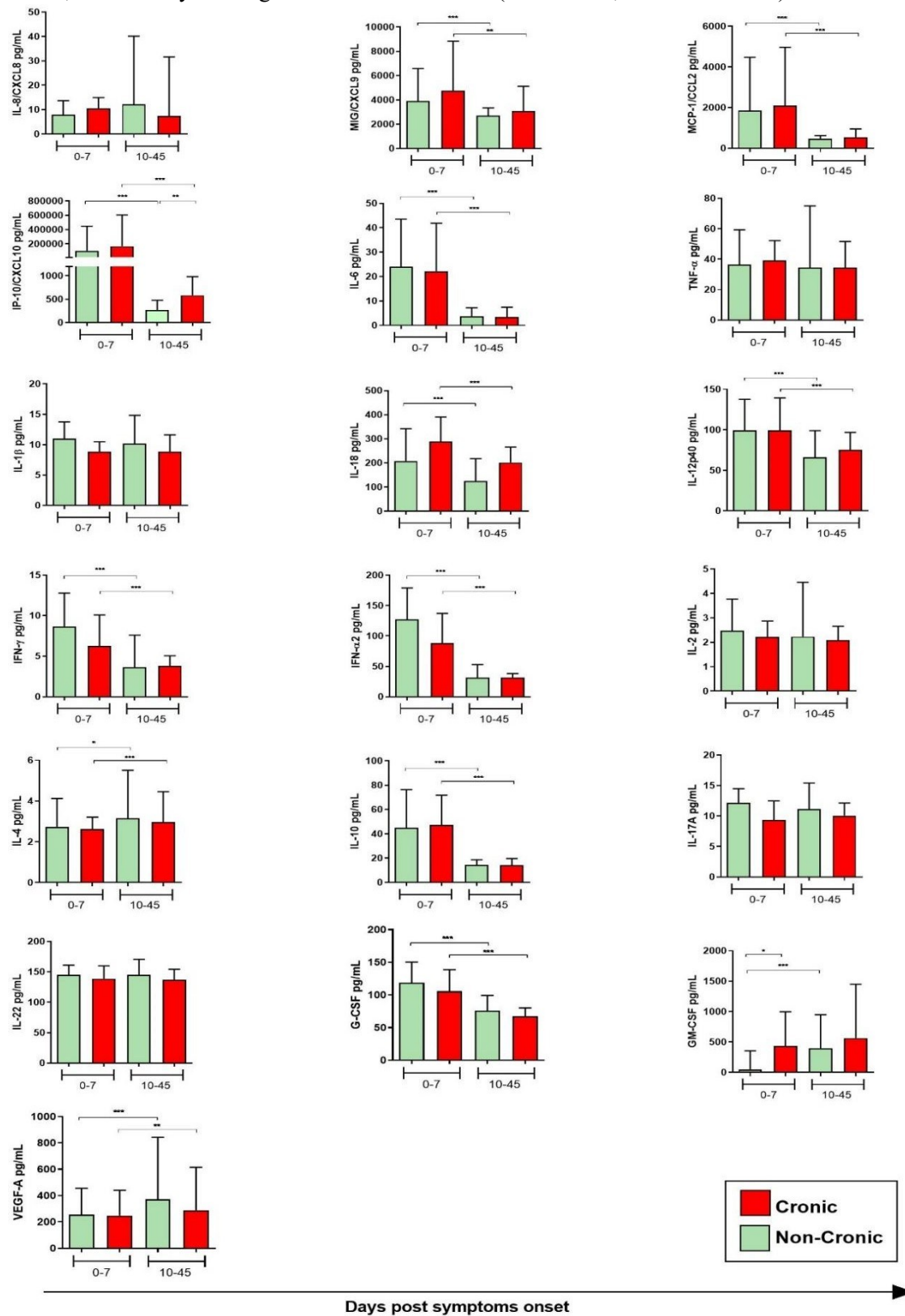
³ Non-Steroid Anti-Inflammatory Drugs (Ketoprofen or Ibuprofen)

⁴ Steroid-Anti-Inflammatory Drugs (Prednisone, Hydrocortisone, Dexamethasone or Prednisolone)

⁵ Tramadol hydrochloride or Codeine

The median values of serum cytokines, chemokines, and growth factors were evaluated in 69 patients (two patients did not have sufficient sample volume stored in the -80°C freezer to perform this assay). We compared the biomarker levels between paired samples from patients who developed chronic arthralgia (n=40) and those who did not (n=29). Additionally, we compared the biomarker levels at 0-7 DPSO and 10-45 DPSO in patients' serum samples for both groups. The results showed statistically significant higher levels of CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, IL-6, IL-18, IL-12p40, IFN- γ , IFN- α 2, IL-10 and G-CSF in the early-acute phase sample (0-7 DPSO) compared to the convalescent phase sample (10-45 DPSO). Additionally, lower levels of IL-4 and VEGFA were observed in the early-acute phase sample (0-7 DPSO, both in patients who experienced arthralgia for more than 90 days and those who recovered within this period. No significant differences were found in CXCL8/IL8, TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-17, and IL-22, either when comparing the early acute and convalescent phases or when comparing between groups at both time points, although there was a trend of decrease in the convalescent phase without statistical significance. The findings also showed higher levels of GM-CSF at early acute phase sample in the group of patients that developed chronic arthralgia compared to those that recovery. Interestingly, we found lower levels of GM-CSF in the early acute phase compared to the convalescent phase exclusively in the group that recovered within 90 DPSO (Figure 1).

Figure 1 – Serum levels of cytokines, chemokines, and growth factors in paired samples (n=69) collected 0-7 and 10-45 days after symptom onset in patients with RT-qPCR confirmed CHIKV infection, stratified by arthralgia status after 3 months (chronic=40; non-chronic=29).



Comparison between paired samples 0-7- and 10-45-days post symptoms onset within the same group was conducted using the Wilcoxon signed-rank test, while comparisons between samples collected during the same period across groups were performed using the Mann-Whitney test. Statistical significance is indicated as follows: * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$.

To evaluate whether cytokine, chemokine, and growth factor levels at 0-7 and 10-45 DPSO could serve as risk factors for the development of chronic arthralgia, a backward Poisson regression model was applied, including confounding variables such as sex, age, and symptom duration in days. In the univariable model, elevated IP-10/CXCL10 levels at 10-45 DPSO were associated with the development of chronic arthralgia ($p=0.01$; $RR=1.71$). At 0-7 DPSO, elevated IL-18 levels were significantly associated with the development of chronic arthralgia ($p=0.04$; $RR=1.54$) and the frequency of high levels of GM-CSF ($p=0.08$) at 0-7 DPSO and MIG/CXCL9 at 10-45 DPSO ($p=0.09$) showed a trend (Table 3). Older age was significantly associated with the development of chronic arthralgia in both periods ($p<0.01$), with an adjusted risk ratio indicating a positive association ($RR=1.01$). None of the biomarkers remained significantly associated with the development of chronic arthralgia after adjustment in the multivariate model. In the early stage of the disease (0-7 DPSO) high IL-8/CXCL8 levels were more frequent in the group of patients that developed persistent arthralgia >90 DPSO. However, at 10-45 DPSO, elevated IL-8/CXCL8 levels were more common in the non-chronic group, but without statistical significance. The frequency of high levels of MCP-1/CCL2, IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10, IL-17, IL-22, and VEGF-A showed no association with chronic arthralgia at either collection time point.

	0-7 DPSO model						10-45 DPSO model					
	Chronic	Non-Chronic	Crude P value	Crude RR	Adjusted P value	Adjusted RR	Chronic	Non-Chronic	Crude P value	Crude RR	Adjusted P value	Adjusted RR
Clinical Variables	n (%) or median (interquartile range) or Risk Ratio (confidence interval)											
Days post symptoms onset	1 (1-3)	1 (1-2)	0.35	1.05 (0.93-1.19)	0.77	1.01 (0.90-1.14)	15 (14-17)	16 (14-21)	0.54	0.99 (0.96-1.01)	0.81	0.99 (0.97-1.02)
Sex (F)	32 (76)	16 (55)	0.10	1.53 (0.92-2.55)	0.07	1.59 (0.96-2.65)	32 (76)	16 (55)	0.10	1.53 (0.92-2.55)	0.06	1.60 (0.96-2.64)
Age	42.5 (34-52)	37 (26-40)	<0.01	1.01 (1.00-1.02)	<0.01	1.01 (1.00-1.02)	42.5 (34 - 52)	37 (26-40)	<0.01	1.01 (1.00-1.02)	<0.01	1.01 (1.00-1.02)
Serum biomarkers¹	Frequency n (%) of individuals with high levels of biomarkers or Risk Ratio (confidence interval)											
IL-8 /CXCL8	22 (55)	12 (41)	0.27	1.25 (0.83-1.89)	-	-	17 (42)	17 (59)	0.19	0.76 (0.50-1.15)	-	-
MCP-1/CCL2	21 (52)	13 (46)	0.62	1.10 (0.73-1.65)	-	-	22 (55)	13 (45)	0.41	1.18 (0.78-1.78)	-	-
MIG/CXCL9	22 (56)	11 (39)	0.17	1.33 (0.87-2.02)	-	-	23 (59)	11 (38)	0.09	1.43 (0.93-2.20)	-	-
IP-10/CXCL10 ²	23 (59)	11 (38)	0.09	1.43 (0.93-2.20)	-	-	25 (65)	9 (31)	0.01	1.71 (1.10-2.65)	-	-
IL-1 β	22 (55)	18 (62)	0.55	0.88 (0.59-1.32)	-	-	18 (45)	18 (62)	0.16	0.75 (0.49-1.12)	-	-
IL-18 ³	24 (60)	10 (34)	0.04	1.54 (1.01-2.36)	-	-	23 (57)	11 (41)	0.19	1.31 (0.87-1.97)	-	-
IL-6	20 (50)	15 (52)	0.88	0.88 (0.64-1.45)	-	-	20 (50)	16 (55)	0.67	0.91 (0.61-1.37)	-	-
TNF- α	22 (55)	14 (48)	0.58	1.12 (0.74-1.68)	-	-	17 (42)	14 (48)	0.63	0.90 (0.59-1.36)	-	-
IL-12p40	23 (58)	15 (52)	0.47	1.10 (0.73-1.66)	-	-	21 (52)	14 (48)	0.73	1.07 (0.71-1.61)	-	-
IFN- γ	18 (45)	17 (59)	0.27	0.79 (0.52-1.19)	-	-	19 (47)	12 (41)	0.61	1.10 (0.74-1.65)	-	-
IFN- α 2	17 (42)	17 (59)	0.19	0.76 (0.50-1.15)	-	-	19 (47)	13 (44)	0.82	1.04 (0.69-1.56)	-	-
IL-2	16 (40)	15 (52)	0.34	0.81 (0.53-1.24)	-	-	19 (47)	15 (52)	0.73	0.93 (0.62-1.39)	-	-
IL-4	18 (45)	17 (59)	0.27	0.79 (0.52-1.19)	-	-	21 (52)	15 (52)	0.95	1.01(0.67-1.51)	-	-
IL-10	20 (50)	14 (48)	0.88	1.02 (0.68-1.54)	-	-	17 (42)	15 (52)	0.45	0.85 (0.56-1.29)	-	-
IL-17	16 (40)	16 (55)	0.22	0.77 (0.50-1.17)	-	-	21 (52)	16 (55)	0.95	0.82 (0.63-1.43)	-	-
IL-22	19 (47)	16 (55)	0.53	0.87 (0.58-1.31)	-	-	19 (47)	15 (52)	0.73	0.93 (0.62-1.39)	-	-
GM-CSF	24 (60)	11 (38)	0.08	1.45 (0.95-2.22)	-	-	21 (52)	14 (48)	0.73	1.07 (0.71-1.61)	-	-
G-CSF	17 (42)	17 (59)	0.19	0.76 (0.50-1.15)	-	-	17 (42)	17 (59)	0.19	0.99 (0.98-99)	-	-
VEGF-A	22 (52)	16 (55)	0.81	0.95 (0.64-1.40)	-	-	19 (47)	16 (55)	0.53	0.87 (0.58-1.31)	-	-

Table 3. Risk Ratio for development of arthralgia > 90 days after symptoms onset in patients with laboratorial diagnosis of Chikungunya virus infection confirmed via RT-qPCR according to days post symptoms onset (DPSO) at the time of the visit, Salvador, Bahia, Brazil (2017-2020).

¹ Biomarker continuous variables were transformed into binary variables representing high (1) and low (0) levels, using the overall median across all tested individuals as the cutoff point.

² Data available for 68 individuals at 0-7 DPSO model, as one with a value equal to the cutoff point was excluded from the analysis

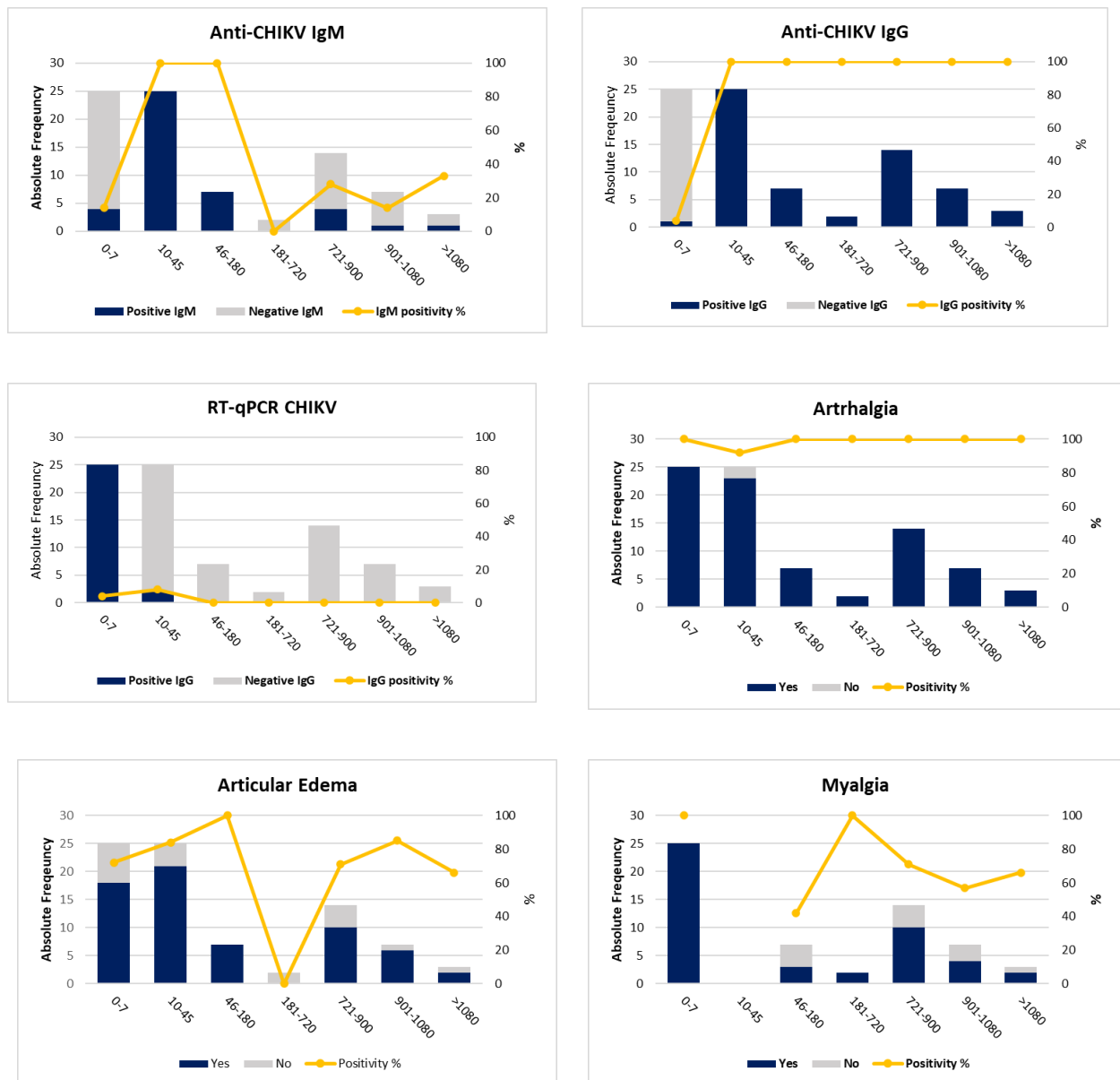
³ Data available for 67 individuals at 0-7 DPSO model, as two with a value equal to the cutoff point were excluded from the analysis

The adjusted model was built by inclusion of variables associated at P<0.20 followed by backward removal of variables not associated with P<0.05 excepted by age, sex and days of symptoms onset that were retained in the model for adjustment.

A subgroup of 59% of patients from the chronic group (25/42) received medical care from a rheumatologist and underwent additional blood sample collection. We evaluated the laboratory results and characteristics of these patients and found that 14% (4/25) and 100% of the samples collected 0-7 and 10-180 DPSO, respectively, had detectable anti-CHIKV IgM. After 181 DPSO, this positivity decreased but remained detectable for many months following symptom onset, showing 28% (4/14), 14% (1/6), and 33% (1/3) in samples collected at 721-900, 901-1080, and >1080 DPSO, respectively. Regarding the detection of anti-CHIKV IgG in follow-up samples, 4% (1/25) positivity was found in samples collected at 0-7 DPSO, while 100% positivity was observed in all other follow-up samples. CHIKV RNA was detected in serum samples at 13 and 16 DPSO, presenting Ct values of 35.6 and 37.9, respectively.

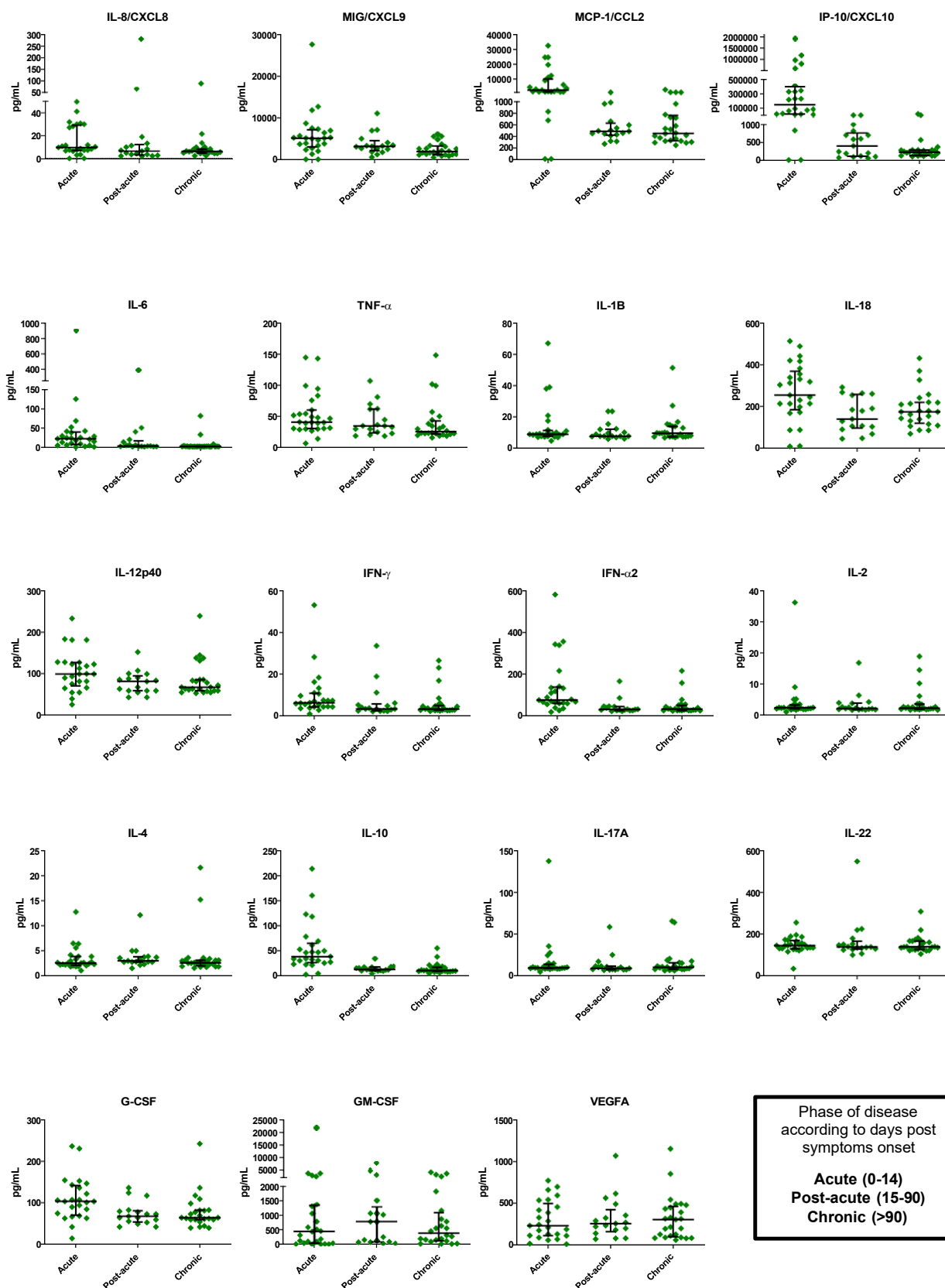
Arthralgia was reported in more than 80% of patients throughout the follow-up period. The frequency of joint edema was no lower than 66% during the entire follow-up, except for two patients who reported no edema between 181 and 720 DPSO. Myalgia was also quite frequent, affecting more than 40% of the patients throughout the entire period. It was reported in 100% of patients at 0-7 DPSO, 42% between 42-180 DPSO, and in 100%, 71%, 57%, and 66% of patients at 181-720, 721-900, 901-1080, and >1080 DPSO, respectively. During the visit at 10-45 DPSO, there was no inquiry regarding myalgia, which is why there is no information about myalgia during this period (Figure 2).

Figure 2. Laboratory and clinical features of patients with RT-qPCR confirmed CHIKV infection who developed chronic arthralgia and had at least one follow-up sample at an outpatient clinic >45 days after symptom onset (n=25)



We also evaluated levels of chemokines, cytokines, and growth factors in the subgroup of patients who had at least one sample collected during follow-up, it was observed that all the chemokines assessed (IL-8/CXCL8, MIG/CXCL9, MCP-1/CCL2, and IP-10/CXCL10) showed a downward trend from acute- to chronic-phase, as did IL-6, IL-10, IL-12p40, IFN- γ , TNF α , IFN α 2, IL-18 and G-CSF. No significant trends or differences were observed in the levels of the remaining biomarkers during the follow-up period as they showed a flat pattern (Figure 3).

Figure 3. Serum levels of cytokines, chemokines, and growth factors in paired samples from patients with RT-qPCR confirmed CHIKV infection who developed chronic arthralgia and had at least one follow-up sample at an outpatient clinic according to disease phase at the moment of sample collection (n=25)



We retrieved partial and nearly complete genomes from 69 out of 71 patients in this study (Table 4). The Ct values ranged from 17.30 to 37.80, with an average depth of >1000 for 98% (67/69) of samples. Coverage relative to the reference genome varied from 48% to 94% and most samples (90%; 62/69) had >70% of coverage (Table 4).

Table 4. Summary of clinical outcome, Ct value and sequencing metrics for the 69 CHIKV new genome sequences.

ID	Arthralgia status >3 months	Ct value	Collection date	Number of Mapped Reads	Average depth	Reference coverage
2922	Chronic	36.71	19/12/2019	85361	1823.6	49.64
2962	Chronic	36.99	13/01/2020	89291	1625.6	55.45
2868	Chronic	37.52	02/12/2019	67562	1178.9	59.41
3163	Chronic	32.9	05/02/2020	130007	1778.6	77.66
2195	Chronic	32.08	11/07/2019	115519	1532.3	83.55
2688	Chronic	32.13	18/10/2019	127195	1546.5	87.28
2543	Chronic	27.66	13/09/2019	138079	1687.5	88.33
2729	Chronic	27.51	25/10/2019	145856	1811.7	88.33
533	Chronic	28.82	19/06/2017	240097	2873.1	89.54
2153	Chronic	26.64	04/07/2019	141468	1717.2	90.72
2461	Chronic	23.92	29/08/2019	103831	1246.3	90.81
2683	Chronic	30.51	18/10/2019	143580	1775.1	91.04
2982	Chronic	23.45	16/01/2020	168947	2006.3	92.37
2343	Chronic	22.95	08/08/2019	198183	2396.5	92.51
3147	Chronic	22.38	30/01/2020	120634	1447.1	92.58
2205	Chronic	23.69	15/07/2019	168658	2036.2	92.83
2256	Chronic	23.66	24/07/2019	200756	2405.8	93.05
2204	Chronic	24.05	15/07/2019	159614	1914.2	93.08
2437	Chronic	18.91	23/08/2019	54442	649.48	93.22
2731	Chronic	26.37	29/10/2019	221540	2644	93.47
2356	Chronic	20.4	09/08/2019	123288	1479.5	93.54
2224	Chronic	20.26	18/07/2019	162888	1976.2	93.57
2313	Chronic	19.75	02/08/2019	147537	1765.8	93.63
2463	Chronic	21.34	29/08/2019	182417	2183.4	93.68
2938	Chronic	18.5	08/01/2020	144374	1727.8	93.68
2467	Chronic	21.53	29/08/2019	191990	2308.1	93.69
3136	Chronic	22.83	29/01/2020	188835	2271.3	93.75
2781	Chronic	22.51	07/11/2019	179902	2157	93.78
2453	Chronic	22.82	28/08/2019	186313	2245.8	93.8
3177	Chronic	22.33	06/02/2020	128965	1530.4	93.85
2775	Chronic	21.13	06/11/2019	145148	1742.3	93.87
3150	Chronic	18.79	31/01/2020	140843	1664.4	93.88
2685	Chronic	18.76	18/10/2019	173605	2075.4	93.89
2647	Chronic	22.65	09/10/2019	179956	2164	93.96
2756	Chronic	18.36	04/11/2019	152261	1805.9	94.23
2133	Chronic	19.83	27/06/2019	126157	1515.7	94.29
2704	Chronic	20.68	22/10/2019	181056	2173.3	94.34

3105	Chronic	20.06	22/01/2020	162346	1950.4	94.41
2650	Chronic	22.96	09/10/2019	172992	2063.8	94.42
2822	Chronic	20.05	20/11/2019	255445	3027	94.42
2855	Non-Chronic	33.49	28/11/2019	109703	2210.2	47.74
2274	Non-Chronic	31.75	29/07/2019	88132	1624.2	54.47
3233	Non-Chronic	34.53	18/02/2020	156345	2589	55.97
2869	Non-Chronic	37.75	03/12/2019	121042	1819	69.9
2584	Non-Chronic	36.16	24/09/2019	157232	2002.8	83.03
2233	Non-Chronic	27.9	19/07/2019	111976	1399.8	84.11
2220	Non-Chronic	28.17	17/07/2019	189556	2455.2	84.42
2257	Non-Chronic	21.74	25/07/2019	143820	1764.9	88.27
2960	Non-Chronic	24.36	13/01/2020	121094	1459	89.33
2429	Non-Chronic	24.87	23/08/2019	214223	2580.6	89.43
2859	Non-Chronic	21.97	28/11/2019	97543	1183.2	90.2
2737	Non-Chronic	26.19	30/10/2019	137174	1663.6	91.38
2800	Non-Chronic	24.46	13/11/2019	130622	1562.4	91.41
3203	Non-Chronic	17.3	11/02/2020	82459	997.06	91.66
2280	Non-Chronic	25.29	30/07/2019	137502	1660.4	91.9
2098	Non-Chronic	28.82	10/06/2019	117659	1396	92.13
2558	Non-Chronic	24.79	17/09/2019	165510	1974.7	92.19
2420	Non-Chronic	21.64	22/08/2019	151073	1826.9	93.07
2669	Non-Chronic	24.25	14/10/2019	130457	1554.6	93.14
2357	Non-Chronic	19.35	09/08/2019	160138	1916	93.61
2391	Non-Chronic	22.81	15/08/2019	176485	2101.1	93.7
2816	Non-Chronic	19.46	19/11/2019	166034	1944.2	93.92
2658	Non-Chronic	21.83	10/10/2019	215800	2575	93.93
3273	Non-Chronic	21.71	04/03/2020	156403	1854.6	94.18
3151	Non-Chronic	18.08	31/01/2020	192658	2289.5	94.19
2871	Non-Chronic	19.3	04/12/2019	133931	1600.8	94.23
2826	Non-Chronic	23.79	21/11/2019	157092	1863.5	94.23
2703	Non-Chronic	21.74	22/10/2019	97405	1167.9	94.4
3127	Non-Chronic	20.16	28/01/2020	200768	2369.9	94.4

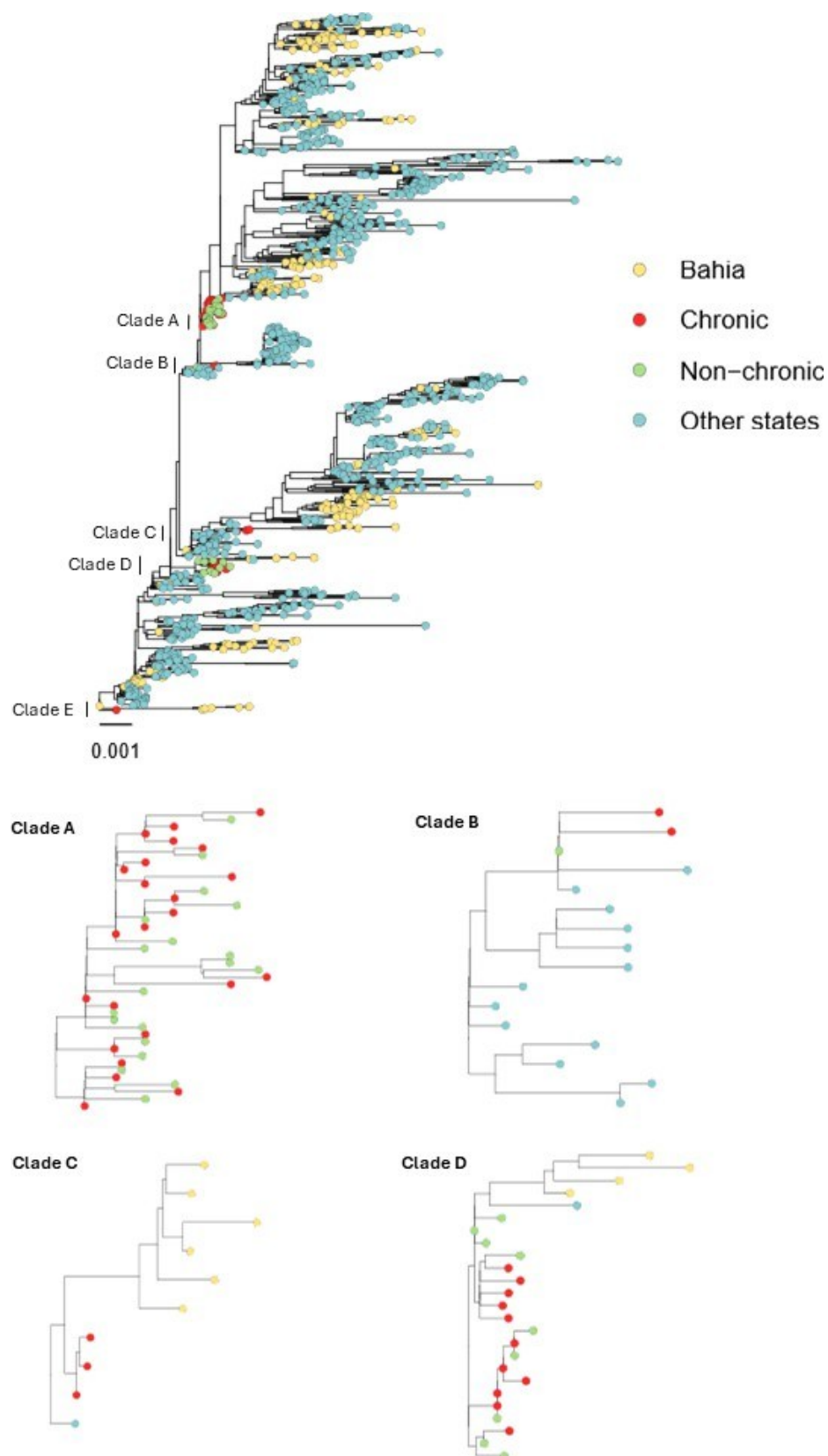
A total of 24 missense mutations were identified in the group that developed chronic symptoms, and, in some cases, the same mutation was detected in sequences from different patients. The highest frequency of individuals sharing the same mutation was three, specifically for the mutations G2967A (NSp2), C5008T (NSp3), and C9500T (E2). Additionally, 17 unique mutations were found in the group that did not develop chronic symptoms. The other mutations described were similarly identified in both groups (Table 5).

Table 5. Missense mutations identified in the newly sequenced genomes of CHIKV obtained from Chikungunya patients confirmed by RT-qPCR according to arthralgia status after 3 months of symptoms onset in Salvador between 2019 and 2020. Reference genome (KP164568)

Nucleotide mutation	Missense mutation	Protein	Chronic patients n=40	Non-Chronic patients n=29	Total n=69
				n (%)	
T400A	L108Q	NsP1	0	1 (3.4)	1 (1.4)
A444G	M123V	NsP1	1 (2.5)	0	1 (1.4)
A 453G	I149V	NsP1	17 (42.5)	12 (41.4)	29 (42.0)
A568T	H164L	NsP1	1 (2.5)	0	1 (1.4)
A765G	K253E	NsP1	2 (5.0)	0	2 (2.9)
A774G	K256E	NsP1	0	1 (3.4)	1 (1.4)
G874A	R289K	NsP1	1 (2.5)	0	1 (1.4)
T1372C	L455P	NsP1	0	1 (3.4)	1 (1.4)
A1681G	E23G	NsP2	1 (2.5)	0	1 (1.4)
G1707A	V32I	NsP2	0	1 (3.4)	1 (1.4)
C2053T	A147V	NsP2	0	1 (3.4)	1 (1.4)
C2667G	P352A	NsP2	39 (97.5)	29 (100.0)	41 (59.4)
G2802A	V397I	NsP2	0	1 (3.4)	1 (1.4)
T2826C	S405P	NsP2	2 (5.0)	0	2 (2.9)
C2914G	T434M	NsP2	1 (2.5)	2 (6.9)	3 (4.3)
G2967A	V452M	NsP2	3 (7.5)	0	3 (4.3)
A3009C	M466L	NsP2	22 (55.0)	19 (65.5)	41 (59.4)
A3034G	K474R	NsP2	1 (2.5)	0	1 (1.4)
G3246T	A545S	NsP2	38 (95.0)	27 (93.1)	65 (94.2)
G3393A	D594N	NsP2	1 (2.5)	0	1 (1.4)
T4242C	S79P	NsP3	1 (2.5)	0	1 (1.4)
G4344A	V113I	NsP3	1 (2.5)	0	1 (1.4)
C5008T	A334V	NsP3	3 (7.5)	0	3 (4.3)
T5074A	V356D	NsP3	1 (2.5)	0	1 (1.4)
G5304A	E433K	NsP3	1 (2.5)	0	1 (1.4)
C5377T	T457I	NsP3	1 (2.5)	0	1 (1.4)
C5563T	T519M	NsP3	1 (2.5)	0	1 (1.4)
T5874A	S93T	NsP3	0	1 (3.4)	1 (1.4)
A5928G	I111V	NsP4	23 (57.5)	13 (44.8)	36 (52.2)
C6120A	Q175K	NsP4	1 (2.5)	0	1 (1.4)
A6286G	K230R	NsP4	0	1 (3.4)	1 (1.4)
C6423A	L276M	NsP4	1 (2.5)	0	1 (1.4)
C/G7289A	A481D/N	NsP4	0	1 (3.4)	1 (1.4)
T7358A	D564E	NsP4	0	1 (3.4)	1 (1.4)
G/C7664A	R33H/Q	Capsid	5 (12.5)	2 (6.9)	7 (10.1)
C7796T	P77L	Capsid	0	1 (3.4)	1 (1.4)
A8438G	E27G	E3	1 (2.5)	1 (3.4)	1 (1.4)
C8573T	A11V	E2	0	1 (3.4)	1 (1.4)
C8965T	H142Y	E2	1 (2.5)	0	1 (1.4)
T9206C	V222A	E2	0	1 (3.4)	1 (1.4)
T9332C	V264A	E2	1 (2.5)	0	1 (1.4)
A9386G	Q282R	E2	0	1 (3.4)	1 (1.4)
C9478T	H313Y	E2	0	1 (3.4)	1 (1.4)
C9500T	T320I	E2	3 (7.5)	0	3 (4.3)
A9526G	T329A	E2	0	1 (3.4)	1 (1.4)
T10031C	V13A	E1	1 (2.5)	0	1 (1.4)
T10073C	M27T	E1	1 (2.5)	0	1 (1.4)
G10183A	G64S	E1	0	1 (3.4)	1 (1.4)
C10379T	A129V	E1	1 (2.5)	0	1 (1.4)
A10625C	K211T	E1	40 (100)	29 (100)	69 (100)
G10798A	V269M	E1	29 (72.5)	20 (69)	49 (71)
G10906A	A305T	E1	40 (100)	29 (100)	69 (100)

Phylogenetic analyses revealed no differential clustering between isolates from patients classified as chronic and non-chronic among the 69 evaluated patients. The samples clustered randomly into five clades, four of which (A, B, C, and D) are detailed in Figure 1. One sample was not shown in detail, as its grouping was isolated. In clade A, it was possible to observe clustering between samples from patients in both groups regarding arthralgia status after 90 DPSO (chronic and non-chronic). Meanwhile, in clades B, C, and D, the study's samples were also grouped with other sequences from Bahia as well as from other states. Furthermore, there was no evidence of genetic recombination, and the Simmonds Association Index was 0.9204, indicating no compartmentalization between the two groups.

Figure 4. Phylogenetic tree based on the complete genome sequence of Chikungunya Virus isolates obtained between 2019 and 2020 in the city of Salvador, Bahia, comparing arthralgia status after 90 days of symptoms onset (chronic and non-chronic) patient groups from Bahia and other Brazilian states, inferred by the maximum likelihood method.



Discussion

In this study, we observed a high prevalence of chronic arthralgia (59%) among study patients. The risk of developing chronic arthralgia increased with age and was also higher among individuals who reported edema during the acute phase of the illness. Women demonstrated an elevated relative risk (RR=1.53), with more than a 50% increase in likelihood. Although this difference was not statistically significant, women were at a higher risk of experiencing chronic arthralgia compared to men. These findings are consistent with various studies that previously identified age, as well as female sex as a risk factor for developing arthralgia (17–22). While older age was a risk factor for developing chronic arthralgia, younger individuals are not exempt, highlighting the impact and importance of the disease for the general population.

A significantly higher frequency of joint edema was observed in the acute phase in patients who developed chronic arthralgia. The difference was even more pronounced for the knees and ankles among those who developed chronic arthralgia. Edema is one of the key signs of inflammation, promoting increased vascular permeability, elevated levels of immune mediators and the infiltration of immune cells into joints and adjacent tissues and have already been reported as risk factor for persistent arthralgia (23–25). These findings may be associated with the innate immune response characterized by intense inflammation and activation of pro-inflammatory cells and mediators triggered by CHIKV.

Patients who develop chronic arthralgia tend to present a classic chikungunya profile (high frequency of joint pain, swelling and higher frequency of rash) what may have led physicians to more accurately suspect the disease. Interestingly, more than 40% of patients in both groups used SAID, in this study, however, the use of steroids did not demonstrate any benefit regarding the outcome or resolution of symptoms. since a similar proportion of patients in both groups used the medication within 0-7 days of symptom onset. On the other hand, the higher proportion of opioid use during the acute phase among patients who later developed chronic arthralgia suggests that these patients may require more intensive pain management, as indicated by the prescription and use of opioids for pain control.

The evaluation of cytokines, chemokines, and growth factors indicated higher levels of pro-inflammatory mediators of the innate immune response, such as MIG/CXCL9, MCP1/CCL2, IP10/CXCL10, IL-6, IL-18, IL-12p40, IFN- γ , IFN α 2, regulatory cytokine IL-10 and the growth factor G-CSF were also elevated 0-7 DPO compared to the samples collected 10-45 DPO, regardless of the outcome. These results are consistent with earlier studies that emphasized the

significant production of various inflammatory mediators, as a hallmark of the acute phase of CHIKV infection (24,29,30). It has also been reported that these mediators are elevated in the acute phase of the disease compared to the convalescent phase, including the cytokine IL-10 (31). This occurs due to the robust expansion of monocytes during the acute phase of CHIKV infection, which triggers an intense innate and inflammatory immune response (29). IL-10 is a cytokine with regulatory functions in inflammation that plays a central role in the immune response against pathogens through a positive feedback cycle, thereby preventing damage to the host from exacerbated inflammation. Its levels correlate with those of pro-inflammatory cytokines; as inflammation decreases, serum levels tend to decrease, maintaining tissue homeostasis (32).

Elevated levels of the growth factor GM-CSF in the period between 0-7 DPSO and IP-10-CXCL10 at 10-45 DPSO were statistically associated with developing chronic arthralgia when comparing groups medians. The chemokine IP-10/CXCL10 remained associated ($p=0.01$; $RR=1.71$) in the bivariate analysis using Poisson Regression (considering the variables as categorical - high and low) and it also showed a trend toward higher levels ($p=0.09$; $RR=1.43$) in the 0-7 DPSO in the chronic arthralgia group. IP10/CXCL10 is involved in autoimmune diseases and chronic inflammatory disorders, as it can promote persistent infiltration of immune cells. In cases of chronic arthralgia or viral infections like chikungunya, elevated levels of this chemokine may reflect ongoing inflammation or immune dysregulation, which could lead to prolonged symptoms.

We also identified that GM-CSF showed a trend ($p=0.08$; $RR=1.45$) toward association, although not statistically significant. GM-CSF can promote the survival, adhesion, and migration of neutrophils and is also described as a potential target for the treatment of inflammatory and autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis (33,34). Interestingly, in previous studies by our team (35) we identified elevated levels of IL-8/CXCL8 as a risk factor for chronicity—a chemokine also known as a potent activator and recruiter of neutrophils to inflammatory sites, leading us to suggest a possible involvement of neutrophils in the immunopathogenesis of chronic arthralgia. Although we observed the same trend in the samples from this study, the findings were not statistically significant for IL-8/CXCL8, possibly due to the small sample size. In the previous study, we had not measured GM-CSF for comparison. Another interesting finding in the bivariate analyses was that in samples collected during the 0-7 DPSO period, high levels of IL-18 were also associated ($p=0.04$; $RR=1.54$) with the chronicity of arthralgia and of IFN- γ and IFN- $\alpha 2$ showed a trend toward protection, even though

they were not associated in the multivariable model. Interferons are potent antivirals that may provide protection. An inefficient antiviral response may lead to the host's inability to eradicate the pathogen and could be a possible explanation for the persistence of CHIKV and/or chronic arthralgia (36). IL-18 is an inducer of IFN- γ , which demonstrates that the immune response to CHIKV triggers a robust innate immune response with cytokines associated with viral defense. On the other hand, in the group of individuals who developed chronic arthralgia, there was a negative correlation between high levels of IL-18 and low levels of IFN- γ . These findings may correspond to a sustained inflammatory process or immune system dysregulation, as there is considerable evidence that components of the host's innate and/or inflammatory immune response can play a pathological role during CHIKV infection, given that a poorly regulated or inappropriate response promotes immune-mediated pathology associated with CHIKV infection. (37)

However, in the adjusted multivariable analysis using Poisson regression, it was not possible to find an association with any of the evaluated factors; only age remained associated, with a 1% increased risk for each additional year of age. Since the cytokines that were associated in the bivariate analysis lost their association when adjusted for sex and age, it is likely that the production of these cytokines is influenced by age. This suggests that the production of these cytokines may be modulated by age, which could compromise the direct interpretation of the relationship between the cytokines and the outcome. Part of these findings may have by chance, influenced by the sample size or even the number of days of symptoms at the time of collection since when adjusted by sex, age and days of symptoms. One of the challenges in analyzing and comparing data from cytokine, chemokine, and growth factor measurements in serum is the variability of results across studies, which depends on cohort size, diagnostic methods, symptom duration, and case definition criteria such as severity and chronic arthralgia (38).

Furthermore, we showed that patients who took anti-inflammatory drugs, especially SAIDs, which directly affect the immune response and can alter and suppress the levels of immunological mediators. This represents a potential bias when comparing our findings with those of other studies. Patients with CHIKV infection showed high viral loads in samples collected 0-7 DPO, with no differences between the groups, and it was not identified as a risk factor in this study. Serological diagnosis by ELISA IgM indicated that 14% (10/71) of participants had detectable IgM, and 3% (3/61) had detectable IgG in the acute phase samples. In convalescent phase samples, 96% (63/65) had IgM and 100% (71/71) of participants tested to date had detectable IgG. These findings indicate that CHIKV infected patients develop a

robust inflammatory immune response capable of triggering a strong humoral immune response during the initial phase of the disease resulting in specific antibody production.

Viral persistence was not observed in the serum samples of patients who were followed up. In contrast, some cases presented IgM detectable for more than 3 years after symptom onset. Although this has been reported in previous studies (39,40) the mechanisms associated with the persistence of anti-CHIKV IgM, in the absence of detectable viral infection in the serum of patients following CHIKV infection, are not yet understood.

Interestingly, one patient confirmed to have CHIKV infection by RT-qPCR (Ct 37.75) did not have detectable anti-CHIKV IgM in paired samples from 0-7 and 10-45 DPSO but did have a positive IgG result in both time-points. Curiously, this patient reported a previous diagnosis of chikungunya and did not receive follow-up care. The viral load in serum was 57.1 copies/ μ L, and the coverage in WGS was 69%. Given the evidence, this appears to be a case of reinfection, but we lack the necessary tools to confirm this hypothesis.

The viral sequences obtained from RNA extracted from patients' serum samples belonged to the ECSA genotype, showing that the genotype responsible for the outbreaks in 2019-2020 in Salvador has remained the same 6 years after its introduction in 2014. This is consistent with other studies that have analyzed circulating genotypes in the city of Salvador, Bahia (11,41,42) and other states of Brazil. No clade clustering was observed in the sequences obtained during the early acute phase that could predict chronicity, as the sequences from both groups were distributed across the clades. There was no evidence that genetic variations in CHIKV were linked to the clinical outcome.

The missense mutations V452M in NSp2 and A334V mutation in NSp3 detected in 3 acute-phase samples of patients who later developed chronic arthralgia were also detected in three genome sequences of CHIKV isolated from patients with persistent arthralgia in Rio de Janeiro state, Brazil (43). The sequences in the dataset containing mutations found in the chronic group were reviewed for clinical status information. Only one sequence included clinical status data, which did not indicate chronification. However, no details regarding the disease stage were provided in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database or the related article for the other sequences. We also identified a V264A mutation in the E2 protein in one of the sequences obtained from patients who developed chronic symptoms. This mutation has already been described as responsible for significantly increasing CHIKV fitness in *Aedes aegypti*, leading to higher infectivity, dissemination, and transmission rates. Missense mutations

are a type of genetic mutation in which a single nucleotide change results in the substitution of one amino acid for another in the protein sequence (44). This type of mutation can alter the protein's structure and function, potentially leading to a variety of outcomes depending on the nature of the substitution (45). Although we found some previously described mutations, the frequency with which they occurred was low in the study samples and, therefore, did not represent clinical significance. Further sequencing studies of samples from patients with information on disease outcomes, along with in-depth analysis of reads and the proportion of mutations within individuals, may help clarify these points and determine whether the identified mutations have a noticeable impact on protein function or are related to CHIKV virulence and disease outcomes.

This project has some limitations that may have impacted on the results. First, COVID-19 pandemic in 2020 significantly disrupted the study's timeline and the ability to maintain consistent follow-up with participants. These factors collectively hindered the robustness of the study's findings. A portion of the data (46 out of 71) regarding the duration of arthralgia is self-reported through phone contact, which may introduce bias. Blood samples were not collected at strict intervals. Additionally, there was an absence of a comparison group for those recovered for more than 90 days, limiting the ability to assess the full impact of the disease. All 25 patients who continued in follow-up developed chronic arthralgia. Therefore, the results should be interpreted with caution, considering the small sample size and the fact that it was a convenience sample.

This study aimed to evaluate both patient characteristics and viral factors that could be associated with chronicity. Altogether, the findings suggest that patient-related factors as age, sex, levels of innate immune response mediators and presence of articular edema at early acute-phase of disease may be more important than virus-related factors in the development of chronic arthralgia, although further studies are needed to confirm or rule out associations between viral protein mutations and virulence or pathogenicity.

Acknowledgements

We thank all study participants, the field and laboratory technicians, the "Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz (RPT/FIOCRUZ) – RPT01Q Plataforma de Vigilância Molecular" for their support in NGS sequencing and consensus assembly.

References

1. Robinson MC. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 1o de janeiro de 1955 [citado 8 de junho de 2020];49(1):28–32. Disponível em: [https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/0035-9203\(55\)90080-8](https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/0035-9203(55)90080-8)
2. Lumsden WHR. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953 II. General description and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 1o de janeiro de 1955 [citado 10 de julho de 2022];49(1):33–57. Disponível em: <https://academic.oup.com/trstmh/article/49/1/33/1904671>
3. Weaver SC, Forrester NL. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Res.* agosto de 2015; 120:32–9.
4. Contopoulos-Ioannidis D, Newman-Lindsay S, Chow C, LaBeaud AD. Mother-to-child transmission of Chikungunya virus: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 1o de junho de 2018;12(6): e0006510.
5. Simmons G, Brès V, Lu K, Liss NM, Brambilla DJ, Ryff KR, et al. High incidence of chikungunya virus and frequency of viremic blood donations during epidemic, Puerto Rico, USA, 2014. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 1o de julho de 2016 [citado 8 de setembro de 2020];22(7):1221–8. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4918147/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26911477/)
6. de Souza WM, de Lima STS, Simões Mello LM, Candido DS, Buss L, Whittaker C, et al. Spatiotemporal dynamics and recurrence of chikungunya virus in Brazil: an epidemiological study. *Lancet Microbe* [Internet]. 1o de maio de 2023 [citado 6 de dezembro de 2023];4(5):e319–29. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37031687/>
7. Figueiredo LTM. Large outbreaks of Chikungunya virus in Brazil reveal uncommon clinical features and fatalities. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 1o de setembro de 2017 [citado 26 de outubro de 2024];50(5):583–4. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/mpbWK3V7Cbvf77S9pRrhmmr/>
8. Kang H, Auzenberg M, Clapham H, Maure C, Kim JH, Salje H, et al. Chikungunya seroprevalence, force of infection, and prevalence of chronic disability after infection in endemic and epidemic settings: a systematic review, meta-analysis, and modelling study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 1o de maio de 2024 [citado 15 de julho de 2024];24(5):488–503. Disponível em: <http://www.thelancet.com/article/S1473309923008101/fulltext>
9. Wahid B, Ali A, Rafique S, Idrees M. Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. *International Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 1o de maio de 2017 [citado 26 de outubro de 2024]; 58:69–76. Disponível em: <http://www.ijidonline.com/article/S1201971217300899/fulltext>
10. BRASIL. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. 2014 [citado 3 de maio de 2019]; Disponível em: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/maio/04/2015-016---Boletim-Dengue-SE15-2015.pdf>
11. Teixeira MJ, Andrade AMS, Costa MC, et al. East/Central/South African Genotype Chikungunya Virus, Brazil, 2014. *Emerging Infectious Disease journal.* 2015; 21:906–7.

12. CIEVS SALVADOR. Boletim 23_2020 SMS_DVIS – Situação Epidemiológica Da Chikungunya Em Salvador – Cievs – Sms/Ssa [Internet]. 2020 [citado 26 de outubro de 2024]. Disponível em: http://www.cievs.saude.salvador.ba.gov.br/download/boletim-23_2020-sms_dvis-situacao-epidemiologica-da-chikungunya-em-salvador/
13. BAHIA. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas (Dengue, Chikungunya e Zika) - Secretaria de Saude do Estado da Bahia. 2020.
14. Vogels C. DengueSeq: A pan-serotype whole genome amplicon sequencing protocol for dengue virus v2. 2 de agosto de 2023 [citado 26 de outubro de 2024]; Disponível em: <https://protocols.cloud/view/denguseq-a-pan-serotype-whole-genome-amplicon-seq-cx44xqyw>
15. Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol* [Internet]. 1o de março de 2015 [citado 26 de outubro de 2024];1(1). Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/ve/vev003>
16. Wang TH, Donaldson YK, Brett RP, Bell JE, Simmonds P. Identification of Shared Populations of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infecting Microglia and Tissue Macrophages outside the Central Nervous System. *J Virol*. dezembro de 2001;75(23):11686–99.
17. 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. La Beaud AD, organizador. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 10 de março de 2009 [citado 8 de fevereiro de 2021];3(3):e389. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0000389>
18. Hoarau JJ, Bandjee MCJ, Trotot PK, Das T, Li-Pat-Yuen G, Dassa B, et al. Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response. *The Journal of Immunology* [Internet]. 15 de maio de 2010 [citado 16 de agosto de 2021];184(10):5914–27. Disponível em: <https://www.jimmunol.org/content/184/10/5914>
19. 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* [Internet]. 1o de agosto de 2013 [citado 25 de outubro de 2022];89(1054):440–7. Disponível em: <https://pmj.bmj.com/content/89/1054/440>
20. Mohd Zim MA, Sam IC, Omar SFS, Chan YF, AbuBakar S, Kamarulzaman A. Chikungunya infection in Malaysia: Comparison with dengue infection in adults and predictors of persistent arthralgia. *Journal of Clinical Virology*. 1o de fevereiro de 2013;56(2):141–5.
21. van Aalst M, Nelen CM, Goorhuis A, Stijns C, Grobusch MP. Long-term sequelae of chikungunya virus disease: A systematic review. Vol. 15, *Travel Medicine and Infectious Disease*. Elsevier USA; 2017. p. 8–22.
22. Silva MMO, Kikuti M, Anjos RO, Portilho MM, Santos VC, Gonçalves TSF, et al. Risk of chronic arthralgia and impact of pain on daily activities in a cohort of patients with chikungunya virus infection from Brazil. *International Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 1o de abril de 2021 [citado 16 de abril de 2021]; 105:608–16. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.03.003>

23. Ramachandran V, Kaur P, Kanagasabai K, Vadivoo S, Murhekar M. Persistent arthralgia among Chikungunya patients and associated risk factors in Chennai, South India. *J Postgrad Med* [Internet]. 2014 [citado 25 de outubro de 2022];60(1):3. Disponível em: <https://www.jpgmonline.com/article.asp?issn=0022-3859;year=2014;volume=60;issue=1;spage=3;epage=6;aulast=Ramachandran>
24. Jacob-Nascimento LC, Carvalho CX, Silva MMO, Kikuti M, Anjos RO, Fradico JRB, et al. Acute-Phase Levels of CXCL8 as Risk Factor for Chronic Arthralgia Following Chikungunya Virus Infection. *Front Immunol*. 1o de outubro de 2021; 12:3831.
25. Imad HA, Matsee W, Kludkleeb S, Asawapaithulsert P, Phadungsombat J, Nakayama EE, et al. Tropical Medicine and Infectious Disease Post-Chikungunya Virus Infection Musculoskeletal Disorders: Syndromic Sequelae after an Outbreak. 2021; Disponível em: <https://doi.org/10.3390/tropicalmed6020052>
26. Glesby MJ, Gulick RM. Selecting Treatments during an Infectious Disease Pandemic: Chasing the Evidence. *Ann Intern Med*. 1o de outubro de 2021;174(10):1464–5.
27. Her Z, Malleret B, Chan M, Ong EKS, Wong SC, Kwek DJC, et al. Active Infection of Human Blood Monocytes by Chikungunya Virus Triggers an Innate Immune Response. *The Journal of Immunology* [Internet]. 15 de maio de 2010 [citado 7 de julho de 2021];184(10):5903–13. Disponível em: <https://www.jimmunol.org/content/184/10/5903>
28. Ehrchen JM, Roth J, Barczyk-Kahlert K. More than suppression: Glucocorticoid action on monocytes and macrophages. *Front Immunol* [Internet]. 27 de agosto de 2019 [citado 26 de outubro de 2024];10(AUG):474955. Disponível em: www.frontiersin.org
29. Wauquier N, Becquart P, Nkoghe D, Padilla C, Ndjoyi-Mbiguino A, Leroy EM. The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. *J Infect Dis* [Internet]. 1o de julho de 2011 [citado 5 de maio de 2019];204(1):115–23. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21628665>
30. Tanabe ISB, Santos EC, Tanabe ELL, Souza SJM, Santos FEF, Taniele-Silva J, et al. Cytokines and chemokines triggered by Chikungunya virus infection in human patients during the very early acute phase. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 1o de novembro de 2019 [citado 26 de outubro de 2024];113(11):730–3. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/trstmh/trz065>
31. Michlmayr D, Pak TR, Rahman AH, Amir ED, Kim E, Kim-Schulze S, et al. Comprehensive innate immune profiling of chikungunya virus infection in pediatric cases. *Mol Syst Biol* [Internet]. agosto de 2018 [citado 12 de dezembro de 2023];14(8):7862. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6110311/](https://pmc/articles/PMC6110311/)
32. Subramanian Iyer S, Cheng G. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. 2012.
33. Lee KMC, Achuthan AA, Hamilton JA. GM-CSF: A Promising Target in Inflammation and Autoimmunity. *Immunotargets Ther* [Internet]. 2020 [citado 26 de outubro de 2024]; 9:225. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7605919/>
34. Kobayashi SD, Voyich JM, Whitney AR, DeLeo FR. Spontaneous neutrophil apoptosis and regulation of cell survival by granulocyte macrophage-colony stimulating factor. *J Leukoc Biol* [Internet]. 4 de outubro de 2005 [citado 26 de outubro de 2024];78(6):1408–18. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16204629/>

35. Jacob-Nascimento LC, Carvalho CX, Silva MMO, Kikuti M, Anjos RO, Fradico JRB, Campi-Azevedo AC, Tauro LB, Campos GS, Moreira PSDS, Portilho MM, Martins-Filho OA, Ribeiro GS, Reis MG. Acute-Phase Levels of CXCL8 as Risk Factor for Chronic Arthralgia Following Chikungunya Virus Infection. *Front Immunol*. 2021 Oct 1; 12:744183. doi: 10.3389/fimmu.2021.744183. PMID: 34659240; PMCID: PMC8517435.
36. Amaral J, Taylor P, Teixeira M, Morrison T, Schoen R, Amaral JK, et al. The Clinical Features, Pathogenesis and Methotrexate Therapy of Chronic Chikungunya Arthritis. *Viruses* [Internet]. 22 de março de 2019 [citado 4 de maio de 2019];11(3):289. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/11/3/289>
37. Long KM, Heise MT. Protective and Pathogenic Responses to Chikungunya Virus Infection. *Curr Trop Med Rep* [Internet]. 1o de março de 2015 [citado 26 de outubro de 2024];2(1):13. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4564112/>
38. Burt FJ, Chen W, Miner JJ, Lenschow DJ, Merits A, Schnettler E, et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 1o de abril de 2017 [citado 4 de maio de 2019];17(4):e107–17. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28159534>
39. Chelluboina S, Robin S, Aswathyraj S, Arunkumar G. Persistence of antibody response in chikungunya. *Virusdisease* [Internet]. 1o de setembro de 2019 [citado 2 de maio de 2021];30(3):469–73. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31803816/>
40. Costa DM do N, Coêlho MRCD, Gouveia PA da C, Bezerra LA, Marques CDL, Duarte ALBP, et al. Long-Term Persistence of Serum-Specific Anti-Chikungunya IgM Antibody - A Case Series of Brazilian Patients. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2021 [citado 2 de maio de 2021];54. Disponível em: www.scielo.br/rsbmt/www.scielo.org.br
41. Tauro LB, Cardoso CW, Souza RL, Nascimento LC, Santos DR dos, Campos GS, et al. A localized outbreak of Chikungunya virus in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 28 de fevereiro de 2019 [citado 3 de maio de 2019];114(0). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762019000100402&lng=en&tlng=en
42. Souza TML, Vieira YR, Delatorre E, Barbosa-Lima G, Luiz RLF, Vizzoni A, et al. Emergence of the East-Central-South-African genotype of Chikungunya virus in Brazil and the city of Rio de Janeiro may have occurred years before surveillance detection. *Sci Rep* [Internet]. 26 de dezembro de 2019 [citado 3 de maio de 2019];9(1):2760. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-39406-9>
43. Lázari CDS, Ramundo MS, Ten-Caten F, Bressan CS, de Filippis AMB, Manuli ER, et al. Clinical markers of post-Chikungunya chronic inflammatory joint disease: A Brazilian cohort. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 6 de janeiro de 2023 [citado 26 de outubro de 2024];17(1):e0011037. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0011037>
44. Stefl S, Nishi H, Petukh M, Panchenko AR, Alexov E. Molecular mechanisms of disease-causing missense mutations. *J Mol Biol* [Internet]. 1o de novembro de 2013 [citado 26 de outubro de 2024];425(21):3919–36. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23871686/>
45. Medina-Carmona E, Betancor-Fernández I, Santos J, Mesa-Torres N, Grottelli S, Batlle C, et al. Insight into the specificity and severity of pathogenic mechanisms associated with

missense mutations through experimental and structural perturbation analyses. Hum Mol Genet [Internet]. 1o de janeiro de 2019 [citado 26 de outubro de 2024];28(1):1–15. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddy323>

6 DISCUSSÃO

O objetivo geral deste estudo foi investigar os fatores de risco e biomarcadores associados ao desenvolvimento de artralgia crônica após a infecção pelo CHIKV, com foco em uma compreensão mais profunda da relação entre mediadores imunológicos, características dos pacientes e fatores intrínsecos do CHIKV. O reconhecimento de padrões imunológicos e sociodemográficos pode ajudar a identificar fatores que contribuem para diferentes desfechos clínicos, facilitando estratégias de manejo e prevenção. Características imunológicas como níveis de anticorpos IgM e IgG anti-CHIKV, e um perfil de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, foram investigados. Estes biomarcadores foram medidos para avaliar se poderiam estar associados ao desenvolvimento ou à resolução da artralgia.

Neste estudo, detectamos anticorpos IgM anti-CHIKV em amostras de pacientes com artralgia crônica coletadas mais de 2 anos após o início dos sintomas sem viremia detectável em amostras de soro. Portanto, é possível que a presença de anticorpos IgM por um período maior possa indicar persistência viral restrita em articulações e tecidos com ativação de células da resposta imune adaptativa desencadeando uma resposta de anticorpos IgM persistente em alguns casos. Estes eventos podem também ter correlação com quadro inflamatório a nível de características clínicas como edema, artralgia e mialgia frequentemente descrito durante todo período de seguimento da coorte assim como biomarcadores como citocinas pró-inflamatórias. Estudos prévios já apontaram que o CHIKV pode escapar à corrente sanguínea e ao sistema imune em “santuários” que seriam tecidos e articulações, de forma que poderiam persistir no organismo, sem viremia detectável no soro (Gasque *et al.*, 2016). Entretanto mais estudos são necessários para determinar se estes achados são válidos para em pacientes que se recuperam após 90 dias e nos indivíduos assintomáticos e qual o mecanismo que explica esta condição.

Além disso, foram avaliadas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, e dentre eles, foram encontrados níveis elevados de GM-CSF e IL-18 nos primeiros dias de sintomas (0-7) e IP-10/CXCL10 na fase convalescente da doença (10-45) nos indivíduos que desenvolveram artralgia crônica foram mais elevados em comparação com o grupo que se recuperou. Estes achados sugerem uma desregulação da resposta imune inata com o avanço da doença em detrimento da resposta imune regulatória que pode estar associada com a manutenção da inflamação. Os achados apontaram ainda que a cinética de mediadores pró-inflamatórios e regulatórios difere entre pacientes que apresentaram recuperação completa e aqueles que evoluíram para a condição crônica. Pacientes com artralgia crônica, por exemplo,

demonstraram perfis imunológicos distintos, incluindo padrões elevados ou sustentados de determinados mediadores, em comparação com os indivíduos sem sintomas persistentes, como demonstrado detalhadamente no Artigo 2.

A carga viral de CHIKV no soro foi medida para determinar possíveis diferenças entre grupos de pacientes e explorar se há correlação com os desfechos clínicos, especialmente o desenvolvimento de artralgia crônica e persistência de anticorpos IgM. Os níveis de carga viral de CHIKV entre os pacientes do estudo foi semelhante e não teve associação com o desenvolvimento de artralgia crônica, como demonstrado no artigo 2. Em relação aos pacientes com artralgia crônica seguidos no estudo de coorte, todas as amostras testadas foram negativas no RT-qPCR sugerindo que a persistência de anticorpos IgM anti-CHIKV ao longo do tempo não possui correlação com viremia detectável nos pacientes estudados. O genótipo ECSA foi identificado através do sequenciamento do genoma completo em todas as amostras do estudo. As sequências do genótipo ECSA obtidas nas amostras do estudo, alinharam em clados juntamente com outras amostras obtidas de surtos de CHIKV na Bahia e outros estados do Brasil entre 2019 a 2020. A análise de mutações de nucleotídeo nas proteínas virais apontou várias mutações em proteínas estruturais, não estruturais e de envelope nas sequências obtidas dos pacientes do estudo tanto em comum quanto diferenciais, porém a frequência com que cada uma das mutações ocorreu foi, em geral, muito baixa. Quando alguma das mutações foi identificada em maior proporção (>10%), ocorreu em ambos os grupos, não sugerindo associação com desfecho clínico. Estes achados sugerem que, isoladamente, a carga viral inicial e características genéticas virais podem não ser um bom preditor destes desfechos.

Neste estudo, a frequência de artralgia crônica nos pacientes acompanhados foi de 59%, sendo que a incidência de artralgia crônica foi mais elevada em mulheres, com idade avançada e que apresentam edema na fase inicial da doença. Pacientes com infecção pelo CHIKV na fase aguda inicial da doença, especialmente os do grupo que posteriormente apresentou cronificação da artralgia, podem necessitar de tratamento medicamentoso para dor intensa desde a os primeiros dias de sintomas, como indicado pela prescrição e uso frequente de anti-inflamatórios esteroides e de opioides. Um estudo recente que também avaliou marcadores clínicos o desenvolvimento de artralgia crônica, demonstrou que os pacientes que evoluíram artralgia crônica utilizaram mais frequentemente analgésicos comuns e opioides, anti-inflamatórios (tanto não esteroidais quanto esteroides) entre 21-90 dias de sintomas comparados aos que se recuperaram. Apesar de não terem avaliado o uso de medicamentos na fase aguda da doença, estes achados reforçam a hipótese de que a manutenção da inflamação consequente dor, leva a

necessidade de tratar estes pacientes da com analgésicos e anti-inflamatório desde os primeiros dias de sintomas, e apesar disso, a inflamação permanece sugerindo a desregulação do sistema imune e inflamação mesmo frente a medicamentos imunossupressores. Outro aspecto a ser considerado é que, se por um lado uma parcela dos pacientes com CHIKV pode ser tratada precocemente com corticoides e opioides, na fase chikungunya crônica acabam recebendo tratamento inadequado devido à falta de padronização no tratamento e pela falta de evidências robustas sobre os benefícios dos corticoides e dos modificadores da resposta imune (que são inclusive comumente utilizados na artrite reumatoide) para o tratamento de artralgia/artrite decorrente da infecção pelo CHIKV (Lázari et al., 2023).

Por fim, o estudo também avaliou características clínicas e sociodemográficas como potenciais fatores de risco, sugerindo que variáveis como idade, sexo e até mesmo outras condições pré-existent não exploradas podem influenciar o desenvolvimento da artralgia crônica após a infecção pelo CHIKV. A artralgia crônica decorrente da infecção pelo CHIKV é uma condição que envolve diversos fatores. É importante destacar que, embora existam perfis mais propensos a desenvolver essa condição, tanto homens quanto mulheres, de diferentes faixas etárias, podem desenvolver artralgia crônica o que ressalta a importância e o impacto da doença na população em geral. A combinação de análises de características virais, imunológicas e sociodemográficas tem o potencial de oferecer uma visão mais abrangente sobre os determinantes da evolução clínica após a infecção pelo CHIKV, facilitando o desenvolvimento de intervenções direcionadas. Este trabalho avaliou características do hospedeiro e do vírus que poderiam estar associadas à cronificação da infecção e ao desenvolvimento de artralgia crônica resultados indicam que as características individuais parecem desempenhar um papel mais significativo do que as propriedades do próprio vírus na progressão para artralgia crônica. Fatores como idade, genética, perfil imunológico e comorbidades do paciente podem influenciar a resposta à infecção pelo CHIKV, afetando a capacidade do organismo de controlar a inflamação, debelar infecção e reparar os danos teciduais nas articulações. De modo que a suscetibilidade ao desenvolvimento de artralgia crônica parece estar mais ligada à predisposição do hospedeiro do que à variabilidade genética do vírus, destacando a importância da medicina de precisão e estratégias individualizadas na prevenção e tratamento da condição.

É urgente a elucidação dos mecanismos imunopatológicos associados à artralgia crônica causada pela infecção pelo vírus CHIKV. Este estudo aponta alguns dos aspectos importantes que ainda precisam ser superados, como o desenvolvimento de intervenções terapêuticas, o aprimoramento do diagnóstico diferencial de Chikungunya baseado apenas em sorologia IgM

e a definição de possíveis estratégias de tratamento baseadas na resposta imune. Além de contribuir para o avanço do conhecimento científico, estes achados podem orientar práticas mais eficazes no manejo clínico da Chikungunya.

7 CONCLUSÃO

- Anticorpos IgM anti-CHIKV podem persistir detectáveis por mais de 2 anos após o início dos sintomas em cerca de 30% dos pacientes com artralgia crônica.
- Uma vez que ocorreu soroconversão, os anticorpos IgG permanecem detectáveis em 100% dos pacientes por, pelo menos, 3 anos após a infecção.
- A resposta imune humoral ao CHIKV, indicada pela detecção e níveis de anticorpos IgM e IgG anti-CHIKV, não diferiu conforme o desfecho clínico em amostras pareadas até 45 dias após início dos sintomas.
- Neste estudo, a carga viral inicial no soro de pacientes com infecção por CHIKV não está correlacionada com o desfecho clínico.
- O genótipo circulante entre as amostras avaliadas durante o surto de CHIKV em Salvador, entre 2019 a 2020, foi o ECSA. O sequenciamento do genoma completo de CHIKV obtido em amostras dos pacientes do estudo não indicou diferenças nas sequências ou mutações associadas com o desfecho clínico.
- Os níveis de GM-CS e IL-18 entre 0-7 DPS e da quimiocina IP-10/CXCL10 entre 10-45 DPS foram mais elevados em pacientes que desenvolvem artralgia crônica em comparação com os que se recuperaram.
- A incidência de artralgia crônica é mais alta em mulheres, com idade avançada e que apresentam edema na fase inicial da doença indicando um perfil de risco para este desfecho.
- Pacientes que desenvolvem artralgia crônica CHIKV podem necessitar de manejo específico para dor desde a fase inicial da doença.
- Embora existam perfis de risco para este desfecho, a artralgia crônica decorrente da infecção pelo CHIKV é multifatorial e pode afetar a população em geral.
- Características do indivíduo parecem desempenhar um papel mais importante do que as do próprio vírus na evolução para artralgia crônica.

REFERÊNCIAS

AMARAL, M. P. *et al.* Prime boost with Chikungunya virus E2 envelope protein combined with Poly (I:C) induces specific humoral and cellular immune responses. **Current Research in Immunology**, v. 2, p. 23–31, 1 jan. 2021.

ANDREW, A. *et al.* Diagnostic accuracy of serological tests for the diagnosis of Chikungunya virus infection: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 2, 1 fev. 2022.

APPASSAKIJ, H. *et al.* Viremic profiles in asymptomatic and symptomatic chikungunya fever: A blood transfusion threat? **Transfusion**, v. 53, n. 10 part. 2, p. 2567–2574, out. 2013.

APPASSAKIJ, H. *et al.* The Potential Impact of Chikungunya Virus Outbreaks on Blood Transfusion. **Transfusion Medicine Reviews**. Saunders, 1 jan. 2020.

BAHIA (Estado). Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. **Boletim epidemiológico da febre Chikungunya na Bahia, 2014**. n. 7, 12 de nov., 2014. Disponível em: https://saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/Boletim_Chikungunya_BA_N7_12112014.pdf. Acesso em: 25 out. 2024.

BAHIA (Estado). Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. **Situação epidemiológica das arboviroses, Bahia, 2015**. n.7 out., 2015. Disponível em: https://saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/Boletim-epidemiol%C3%B3gico-n%C2%BA-07-dengue_chikungunya_zika.pdf. Acesso em: 25 out. 2024.

BAHIA (Estado). Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. **Situação epidemiológica das arboviroses, Bahia, 2016**. n. 6, maio de 2016. Disponível em: https://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/Boletim-epidemi%C3%B3gico-n%C2%BA-06-dengue-_chikungunya_zika-16.05.16.pdf. Acesso em: 25 out. 2024.

BAHIA (Estado). Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. **Boletim epidemiológico das arboviroses, Bahia, 2017**. Salvador: DIVEP/SUVISA, dez. de 2017. Disponível em: <https://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/Boletim-Epidemio-n-12-Arbov-12.12.2017.rev-CAEST.pdf>. Acesso em: 25 out. 2024.

BAHIA (Estado). Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. **Boletim epidemiológico de arboviroses, Bahia, 2018**. Salvador: DIVEP/SUVISA, 2018. Disponível em: <https://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/Dezembro-2018-Boletim-Epidemiol%C3%B3gico-de-Arboviroses.pdf>. Acesso em: 25 out. 2024.

BAHIA (Estado). Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. **Boletim epidemiológico de arboviroses, Bahia, 2019**. Salvador: DIVEP/SUVISA, 2018. Disponível em: <https://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2020/02/boletimEpidemiologicoArbovirosesNovembro2019.pdf>. Acesso em: 25 out. 2024.

BAHIA (Estado). Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. **Boletim epidemiológico das arboviroses urbanas-semana 50**, n. 24, dez., 2020.

BAHIA (Estado). Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. **Boletim epidemiológico das arboviroses 2021**. Salvador: DIVEP/SUVISA, 2021. Disponível em: <https://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/boletimArbovirosesSemana50.pdf>. Acesso em: 25 out. 2024.

BAHIA (Estado). Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. **Boletim epidemiológico das arboviroses**, n. 5, dez., 2022. https://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/boletimEpidemiologicoArbovirosesNo05_dezembro2022.pdf. Acesso em: 25 out. 2024.

BAHIA (Estado). Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. **Boletim epidemiológico das arboviroses 2024**, n.1, jan., 2024. Disponível em: https://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2024/01/boletimEpidemiologicoArbovirosesSE_52_No01_janeiro2024.pdf. Acesso em: 25 out. 2024.

BAHIA (Estado). Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. **Boletim epidemiológico das arboviroses 2024 se 34**. Salvador: DIVEP/SUVISA, 2024.

BANDEIRA, A. C. et al. Prolonged shedding of Chikungunya virus in semen and urine: A new perspective for diagnosis and implications for transmission. **IDCases**, v. 6, p. 100–103, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, v. 45, n. 2, 2014. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_epidemiologico_numero_2_2014.pdf. Acesso em: 25 out. 2024.

BROWNE, E. P. Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors. **Immunology**, v. 136, n. 4, p. 370, ago. 2012.

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

CAMPOS, G. S. et al. First Detection of Chikungunya Virus in Breast Milk. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 36, n. 10, p. 1015–1017, 1 out. 2017.

CARDONA-OSPINA, J. A. et al. Sexual transmission of arboviruses: more to explore? **International Journal of Infectious Diseases**, v. 76, p. 126–127, 1 nov., 2018.

Chikungunya - VLA1553 - Valneva. Disponível em: <https://valneva.com/research-development/chikungunya/>. Acesso em: 26 out. 2024.

CHOW, A. et al. Persistent arthralgia induced by chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 2, p. 149–157, 15 jan., 2011.

COSTA, D. M. DO N. *et al.* Long-term persistence of serum-specific anti-chikungunya igm antibody - a case series of Brazilian patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, 2021.

COUTURIER, E. *et al.* Impaired quality of life after chikungunya virus infection: a 2-year follow-up study. **Rheumatology**, v. 51, n. 7, p. 1315–1322, 2012.

DE BRITO, C. A. A. Alert: Severe cases and deaths associated with Chikungunya in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 585–589, 1 set. 2017.

DE BRITO, C. A. A. *et al.* Classification of chikungunya cases: a proposal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. 1–5, 25 nov. 2020.

DE SOUZA, W. M. *et al.* Pathophysiology of chikungunya virus infection associated with fatal outcomes. **Cell host & microbe**, v. 32, n. 4, p. 606- 622.e8, 10 abr. 2024.

DINIZ, C. *et al.* Recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for the diagnosis and treatment of chikungunya fever. Part 2 - Treatment. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, p. s438–s451, 2017.

DONALISIO, M. R. *et al.* Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 0, 2017.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Clusters of autochthonous chikungunya cases in Italy**: first update. Stockholm: ECDC, 9 oct., 2017. 2017. Disponível em: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/RRA-chikungunya-Italy-update-9-Oct-2017.pdf>. Acesso em: 4 maio. 2019.

ECONOMOPOULOU, A. *et al.* Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005–2006 outbreak on Réunion. **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 4, p. 534–541, 11 abr. 2009.

EVANS-GILBERT, T. Case report: Chikungunya and neonatal immunity: fatal vertically transmitted chikungunya infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 4, p. 913–915, 2017.

FARIA, N. R. *et al.* Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014-2015. **PLoS Currents**, 1 fev. 2016.

FERREIRA, A. S. *et al.* Biomarkers of severity and chronification in chikungunya fever: a systematic review and meta-analysis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 63, p. 1–11, 1 mar. 2021.

FERREIRA MOREIRA, M. Detection of chikungunya virus in saliva and urine samples of patients from Rio de Janeiro, Brazil. a minimally invasive tool for surveillance. **American Journal of Biomedical Science & Research**, v. 12, n. 2, p. 130–133, 8 mar. 2021.

FOX, J. M.; DIAMOND, M. S. Pathogenesis of chikungunya virus immune-mediated protection. **J Immunol References**, v. 197, p. 4210–4218, 2022.

GASQUE, P. *et al.* Chikungunya pathogenesis: from the clinics to the bench. 2016.

GOLDANI, L. Z.; SALORT, S. G. Infectious diseases and the COVID-19 scenario in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 277–278, 2 out. 2020.

GOUPIL, B. A. *et al.* Novel Lesions of Bones and Joints Associated with Chikungunya Virus Infection in Two Mouse Models of Disease: New Insights into Disease Pathogenesis. 2016.

HUITS, R. *et al.* Chikungunya virus infection in Aruba: diagnosis, clinical features and predictors of post-chikungunya chronic polyarthralgia. **PLOS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0196630, 30 abr. 2018.

KRUTIKOV, M.; MANSON, J. Chikungunya virus infection: an update on joint manifestations and management. **Rambam Maimonides medical journal**, v. 7, n. 4, 31 out. 2016.

LAGOS-GALLEGO, M. *et al.* Depression as acute and chronic manifestation of dengue and chikungunya: A systematic review and meta-analysis. 2018.

LÁZARI, C. D. S. *et al.* Clinical markers of post-Chikungunya chronic inflammatory joint disease: A Brazilian cohort. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 1, p. e0011037, 6 jan. 2023.

LIMA MARTINS, H. A. de *et al.* Depression, Anxiety, and Hopelessness in Patients with Chikungunya Fever in Brazil. **Journal of Neuroinfectious Diseases**, v. 07, n. 04, p. 1–2, 29 dez. 2016.

LUMSDEN, W. H. R. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953 II. General description and epidemiology. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 33–57, 1 jan. 1955.

MACHADO, L. C. *et al.* Genome sequencing reveals coinfection by multiple chikungunya virus genotypes in a recent outbreak in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, p. e0007332, 16 maio 2019.

MARQUES, C. D. L. *et al.* Recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and treatment of Chikungunya fever. Part 1 – Diagnosis and special situations. **Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)**, v. 57, p. 421–437, 2017.

MARTINS, E. B. *et al.* Detection of Chikungunya virus in bodily fluids: The INOVACHIK cohort study. 2022.

MCMAHON, R. *et al.* A randomized, double-blinded Phase 3 study to demonstrate lot-to-lot consistency and to confirm immunogenicity and safety of the live-attenuated chikungunya virus vaccine candidate VLA1553 in healthy adults. **Journal of Travel Medicine**, v. 31, n. 2, 1 mar. 2024.

METZ, S. W. *et al.* Effective chikungunya virus-like particle vaccine produced in insect cells. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 3, 2013.

MILLSAPPS, E. M. ; M. ; et al. Chikungunya immunopathology as it presents in different organ systems. **Viruses** **2022**, Vol. **14**, Page **1786**, v. 14, n. 8, p. 1786, 16 ago. 2022.

NG, L. F. P. Immunopathology of chikungunya virus infection: lessons learned from patients and animal models. **Annu. Rev. Virol**, v. 4, p. 413–440, 2017.

NINLA-AESONG, P.; MITARNUN, W.; NOIPHA, K. Proinflammatory Cytokines and Chemokines as Biomarkers of Persistent Arthralgia and Severe Disease After Chikungunya Virus Infection: A 5-Year Follow-Up Study in Southern Thailand.

NINLA-AESONG, P.; MITARNUN, W.; NOIPHA, K. Long-Term persistence of chikungunya virus-associated manifestations and anti-chikungunya virus antibody in Southern Thailand: 5 Years After an Outbreak in 2008–2009.

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 102, 30 dez. 2015.

OLIVEIRA, R. DE M. A. B. et al. Maternal and infant death after probable vertical transmission of chikungunya virus in Brazil -case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, 16 jul. 2018.

OLIVEIRA, R. et al. Chikungunya Death Risk Factors in Brazil, in 2017: A case-control study. **PloS one**, v. 17, n. 4, 1 abr. 2022.

PETERSEN, L. R.; EPSTEIN, J. S. Chikungunya virus – new risk to transfusion safety in the Americas. **Transfusion**, v. 54, n. 8, p. 1911, 2014.

PETITDEMANGE, C.; WAUQUIER, N.; VIEILLARD, V. Control of immunopathology during chikungunya virus infection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 4, p. 846–855, 1 abr. 2015.

PIERRO, A. et al. Persistence of anti-chikungunya virus-specific antibodies in a cohort of patients followed from the acute phase of infection after the 2007 outbreak in Italy. **New Microbes and New Infections**, v. 7, p. 23–25, 1 set. 2015.

POWERS, A. M. Chikungunya. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, n. 1, p. 209–219, 1 mar. 2010.

QUEYRIAUX, B. et al. **Clinical burden of chikungunya virus infection. The Lancet Infectious Diseases**, 2008.

RAMFUL, D. *et al.* Mother-to-child transmission of Chikungunya virus infection. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 26, n. 9, p. 811–815, set. 2007.

REDDY, V. *et al.* Correlation of plasma viral loads and presence of Chikungunya IgM antibodies with cytokine/chemokine levels during acute Chikungunya virus infection. **Journal of Medical Virology**, v. 86, n. 8, p. 1393–1401, 1 ago. 2014.

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

ROSSO, A. *et al.* Immunogenicity and Safety of Chikungunya Vaccines: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Vaccines**, v. 12, n. 9, p. 969, 27 ago. 2024.

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, p. 1–10, 1 dez. 2018.

SCHILTE, C. *et al.* Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 3, p. e2137, 2013.

SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: Epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **Journal of Clinical Investigation**, 1 mar. 2017.

SILVA, M. M. 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: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 69, n. 8, p. 1353–1359, 27 set. 2019.

SILVA, M. M. O. *et al.* Risk of chronic arthralgia and impact of pain on daily activities in a cohort of patients with chikungunya virus infection from Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 105, p. 608–616, 1 abr. 2021.

SIMIÃO, A. R. *et al.* A major chikungunya epidemic with high mortality in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.

SIMMONS, G. *et al.* High incidence of chikungunya virus and frequency of viremic blood donations during epidemic, Puerto Rico, USA, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 7, p. 1221–1228, 1 jul. 2016.

SOUZA, T. M. L. *et al.* Emergence of the East-Central-South-African genotype of Chikungunya virus in Brazil and the city of Rio de Janeiro may have occurred years before surveillance detection. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 2760, 26 dez. 2019.

STAPLES, E.J; HILLS, S. L.; P. A. M. **Chikungunya - Chapter 3 - 2018 Yellow Book | Travelers' Health | CDC**. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/infectious-diseases-related-to-travel/chikungunya>. Acesso em: 6 maio. 2019.

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

TANABE, I. S. B. *et al.* Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 345, 2018.
TEIXEIRA, M. G. *et al.* **East/central/South African genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. Emerging Infectious Diseases**Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2015.

TEIXEIRA, M. J.; ANDRADE, A. M. S.; COSTA, M.C. *et al.* East/Central/South African genotype Chikungunya virus, Brazil, 2014. **Emerging Infectious Disease journal**, v. 21, p. 906–907, 2015.

TELMOS, S. *et al.* Clinical infectious diseases fatal outcome of chikungunya virus infection in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**®, v. 73, n. 7, p. 2436–2479, 2021.

VAIRO, F. *et al.* **Chikungunya: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention. Infectious Disease Clinics of North America** W.B. Saunders, 1 dez. 2019.

VAN AALST, M. *et al.* **Long-term sequelae of chikungunya virus disease: A systematic review. Travel Medicine and Infectious Disease** Elsevier USA, 1 jan. 2017. Acesso em: 9 dez. 2020.

VAN DUIJL-RICHTER, M. K. S. *et al.* **Early events in chikungunya virus infection—from virus cell binding to membrane fusion. Viruses** MDPI AG, 7 jul. 2015.

WANG, S. M. *et al.* Detection and quantification of Chikungunya virus by real-time RT-PCR assay. **Methods in Molecular Biology**, v. 1426, p. 105–117, 2016.

WAUQUIER, N. *et al.* The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. **The Journal of infectious diseases**, v. 204, n. 1, p. 115–23, 1 jul. 2011.

WEAVER, S. C.; FORRESTER, N. L. Chikungunya: evolutionary history and recent epidemic spread. **Antiviral Research**, v. 120, p. 32–39, ago. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO | Chikungunya. **WHO**, 2017.

ZHANG, Y.-N. *et al.* Infectious Chikungunya Virus (CHIKV) with a complete capsid Deletion: a new approach for a CHIKV vaccine. **Journal of Virology**, v. 93, n. 15, ago. 2019.

ANEXO A - TCLE E TALE VIGILÂNCIA PARA DOENÇAS FEBRIS E EXANTEMÁTICAS

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde
Universidade Federal da Bahia
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Vigilância para doenças febris e exantemáticas
 (para os participantes maiores de idade)

Título do Projeto: Arboviroses emergentes: um estudo clínico, epidemiológico e entomológico

Nome do Participante: _____

No. de identificação do participante: _____

Para ser lido por todos os participantes maiores de idade: As informações a seguir descrevem a pesquisa e o seu papel como participante. Por favor, leia com atenção e sinta-se à vontade para tirar qualquer dúvida com o entrevistador.

Objetivo da Pesquisa: Esta é uma pesquisa sobre dengue, chikungunya e zika. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, e pela Universidade Federal da Bahia. A Dengue, a chikungunya e a zika são grandes problemas de saúde pública em Salvador e no Brasil. O diagnóstico dessas doenças na fase inicial é difícil, pois os sintomas como febre, manchas e dor no corpo são comuns a muitas doenças. Nós estamos convidando você a participar desta pesquisa porque você procurou este centro de saúde com sintomas que podem ser de uma dessas doenças. O objetivo desta pesquisa é estudar as características clínicas dessas doenças e tentar entender melhor quais fatores fazem com que as pessoas desenvolvam essas infecções. Você pode ou não estar com alguma dessas doenças e para se ter certeza é necessário fazer exames de sangue, saliva e urina. Alguns dos exames usados para fazer o diagnóstico das doenças são complexos e podem demorar meses para ficarem prontos. Se você concordar, nós examinaremos seu sangue, urina e saliva na tentativa de identificar a causa da doença que você apresentou. Assim que os resultados destes exames estiverem prontos eles serão encaminhados ao seu prontuário no posto de saúde para o benefício de seus cuidados médicos futuros e também poderão ser retirados por você aqui no posto. É possível você não seja beneficiado diretamente pela sua participação nesta pesquisa, mas as informações que nós obtivermos poderão ajudar no diagnóstico, tratamento e controle dessas doenças no futuro.

Procedimentos a serem seguidos: Se você aceitar participar desta pesquisa, após ter lido e entendido este termo de consentimento, o entrevistador fará perguntas a respeito de como você se sente e sobre a história da sua doença. Além disso, precisaremos coletar uma amostra de 10 mililitros (1 colher de sobremesa) do seu sangue e um pouco de sua saliva com um cotonete. Também pediremos que você colete um pouco de urina com um coletor de urina que forneceremos junto com instruções para que você mesmo possa fazer a coleta no banheiro da unidade de emergência. Você pode sentir um pouco de dor no local onde o sangue for coletado e mais raramente pode aparecer uma mancha roxa ou uma infecção no local, mas este risco será reduzido ao mínimo porque um profissional treinado irá realizar a coleta. O sangue, saliva e urina coletados serão utilizados para saber se você teve dengue, chikungunya ou zika. Você precisará retornar a este centro de saúde daqui a duas semanas para que possamos realizar uma nova entrevista e coletar uma segunda amostra de sangue em quantidade igual à primeira amostra de sangue e uma segunda amostra de urina. Caso você não retorne, agendaremos uma visita de nossa equipe à sua casa, para que a entrevista e a segunda coleta de sangue e de urina sejam realizadas em seu domicílio. Isso é importante porque nem sempre é possível confirmar o diagnóstico dessas doenças com as primeiras amostras coletadas. Também aproveitaremos esse segundo momento para coletarmos informações sobre a evolução de sua doença. A equipe de estudo também vai revisar o seu prontuário médico para obter informações sobre a conduta médica e a evolução de sua doença. Se seus exames indicarem que você está com chikungunya, nós te convidaremos para ser avaliado por um médico especialista e antes vamos te esclarecer sobre como será essa avaliação. Caso você aceite, exames laboratoriais e de imagem adicionais poderão ser realizados. Por fim, caso você apresente algum sintoma neurológico, como fraqueza, tontura, alteração visual ou auditiva, te convidaremos para ser avaliado por um médico do projeto e te esclareceremos sobre como será essa avaliação. Caso você aceite, dependendo da avaliação médica, poderemos sugerir a realização de exames laboratoriais ou de imagem adicionais.

Rubrica do investigador: _____ *Rubrica do participante:* _____

No. de identificação do participante: | | | | | | | |

Confidencialidade: Suas respostas durante a entrevista e os resultados dos seus exames serão confidenciais. Apenas você, os responsáveis pelos seus cuidados médicos no posto de saúde, o grupo de pesquisadores deste estudo e os Comitês de Ética em Pesquisas terão acesso a estas informações. Você não será identificado em nenhum relatório ou publicação resultante da pesquisa. Qualquer informação que possa identificá-lo não será divulgada quando os resultados da pesquisa forem apresentados. Entretanto, os profissionais de saúde são obrigados a informar às secretarias de saúde sobre a identificação de casos de dengue, chikungunya e zika. Por isso, se os seus exames forem positivos para alguma dessas doenças nós teremos que informar os resultados à secretaria de saúde.

Participação Voluntária: Sua participação nesta pesquisa é voluntária. Você pode se recusar a participar ou interromper sua participação em qualquer momento. A equipe de estudo também pode optar por encerrar sua participação durante ou no fim da pesquisa. Neste caso, você será avisado. Durante a entrevista, você tem todo o direito de se recusar a responder qualquer pergunta. Também pode se negar a fazer a coleta de sangue, de urina ou de saliva. A recusa em participar de todo ou de parte desta pesquisa não afetará seus cuidados médicos e nem haverá prejuízo em suas relações presentes ou futuras com o posto de saúde ou com as instituições envolvidas na pesquisa. Você não será responsável por nenhuma despesa associada com esta pesquisa e não receberá ajuda financeira para participar do estudo, mas será ressarcido por eventuais gastos, como de transporte. Você tem o direito a indenização e assistência integral frente a qualquer dano decorrente da sua participação na pesquisa. Este termo de consentimento será preenchido em duas vias e você receberá uma das vias.

Grupo de Contato: Se no futuro você tiver qualquer dúvida sobre sua participação ou sobre seus direitos como participante na pesquisa, por favor, entre em contato com o Dr. Guilherme Ribeiro, Pesquisador do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Rua Waldemar Falcão, 121, Brotas, Salvador, telefones (71) 3176-2281 ou 99624-8838, ou com o Comitê de Ética em Pesquisas, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, Salvador, telefone (71) 3176-2285, e-mail: cep@bahia.fiocruz.br.

Consentimento: Eu entendi este termo de consentimento. Minhas perguntas foram devidamente respondidas. Sendo assim, eu voluntariamente concordo em participar do estudo e ter meu sangue, urina e saliva testados para Zika, dengue e chikungunya:

Eu concordo: ☐ Sim ☐ Não

Assim como os vírus Zika e chikungunya recentemente chegaram e se disseminaram pelo Brasil, outros vírus transmitidos por mosquitos podem ser introduzidos e se espalhar acometendo muitas pessoas. Por isso, gostaríamos de sua autorização para, se necessário, testarmos no futuro seu sangue, urina e saliva para outras doenças transmitidas por mosquitos.

Eu concordo: ☐ Sim ☐ Não

Rubrica do investigador: _____ *Rubrica do participante:* _____

No. de identificação do participante: | | | | | | | |

Além disso, essa pesquisa pode permitir o estudo de outras doenças infecciosas que causam sintomas semelhantes aos da Zika, dengue e chikungunya. Este não é o objetivo principal dessa pesquisa, mas já que estamos coletando amostras de seu sangue, urina e saliva, nós temos uma oportunidade de no futuro investigar outras possíveis causas para a sua doença e estudar as semelhanças e diferenças entre os sintomas causados por Zika, dengue e chikungunya daqueles sintomas causados por outras doenças. Por isso, nós gostaríamos de pedir sua autorização para no futuro testar seu sangue, urina e saliva para outras doenças que podem se confundir com a Zika, a dengue e a chikungunya.

Eu voluntariamente concordo que meu sangue, urina e saliva sejam testados para identificar os agentes infecciosas que causam as seguintes doenças:

Resfriado:	☐ Sim ☐ Não	Dor de garganta:	☐ Sim ☐ Não	Caxumba:	☐ Sim ☐ Não
Gripe:	☐ Sim ☐ Não	Catapora / Varicela:	☐ Sim ☐ Não	Leptospirose:	☐ Sim ☐ Não
Pneumonia:	☐ Sim ☐ Não	Síndrome mão-pé-boca	☐ Sim ☐ Não	Coqueluche:	☐ Sim ☐ Não
Sarampo:	☐ Sim ☐ Não	Toxoplasmose:	☐ Sim ☐ Não		
Roséola:	☐ Sim ☐ Não	Mononucleose:	☐ Sim ☐ Não		
Rubéola:	☐ Sim ☐ Não	Citomegalovírus:	☐ Sim ☐ Não		
Rickettsiose:	☐ Sim ☐ Não	Eritema infeccioso:	☐ Sim ☐ Não		

Assinatura do participante do estudo

Data

Hora



Impressão Digital do Participante do Estudo

Assinatura do Investigador

Data

Hora

Assinatura da Testemunha

Data

Hora

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde
Universidade Federal da Bahia
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Vigilância para doenças febris e exantemáticas
 (para os responsáveis legais pelos participantes menores de idade)

Título do Projeto: Arboviroses emergentes: um estudo clínico, epidemiológico e entomológico

Nome do Participante: _____

No. de identificação do participante: _____

Para ser lido por todos os responsáveis legais pelos participantes menores de idade: As informações a seguir descrevem a pesquisa e o seu papel como participante. Por favor, leia com atenção e sinta-se à vontade para tirar qualquer dúvida com o entrevistador.

Objetivo da Pesquisa: Esta é uma pesquisa sobre dengue, chikungunya e zika. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, e pela Universidade Federal da Bahia. A Dengue, a chikungunya e a zika são grandes problemas de saúde pública em Salvador e no Brasil. O diagnóstico dessas doenças na fase inicial é difícil, pois os sintomas como febre, manchas e dor no corpo são comuns a muitas doenças. Nós estamos convidando o (a) menor de idade pelo (a) qual você é responsável a participar desta pesquisa porque ele (a) procurou este centro de saúde com sintomas que podem ser de uma dessas doenças. O objetivo desta pesquisa é estudar as características clínicas dessas doenças e tentar entender melhor quais fatores fazem com que as pessoas desenvolvam essas infecções. Ele (a) pode ou não estar com alguma dessas doenças e para se ter certeza é necessário fazer exames de sangue, saliva e urina. Alguns dos exames usados para fazer o diagnóstico das doenças são complexos e podem demorar meses para ficarem prontos. Se você concordar, nós examinaremos o sangue, urina e saliva dele (a) na tentativa de identificar a causa da doença ele (a) apresentou. Assim que os resultados destes exames estiverem prontos serão encaminhados ao prontuário dele (a) no posto de saúde para o benefício dos cuidados médicos futuros e também poderão ser retirados por você aqui no posto. É possível que ele (a) não seja beneficiado diretamente pela participação nesta pesquisa, mas as informações que nós obtivermos poderão ajudar no diagnóstico, tratamento e controle dessas doenças no futuro.

Procedimentos a serem seguidos: Se você aceitar participar desta pesquisa, após ter lido e entendido este termo de consentimento, o entrevistador fará perguntas a respeito de como o (a) menor de idade pelo (a) qual você é responsável se sente e sobre a história da doença. Além disso, precisaremos coletar uma amostra de 10 mililitros (1 colher de sobremesa) de sangue e um pouco de sua saliva com um cotonete. Também pediremos que ele (a) colete um pouco de urina com um coletor de urina que forneceremos junto com instruções para que vocês mesmos possam fazer a coleta no banheiro da unidade de emergência. Ele (a) pode sentir um pouco de dor no local onde o sangue for coletado e mais raramente pode aparecer uma mancha roxa ou uma infecção no local, mas este risco será reduzido ao mínimo porque um profissional treinado irá realizar a coleta. O sangue, saliva e urina coletados serão utilizados para saber se ele (a) teve dengue, chikungunya ou zika. Ele (a) precisará retornar a este centro de saúde daqui a duas semanas para que possamos realizar uma nova entrevista e coletar uma segunda amostra de sangue em quantidade igual à primeira amostra de sangue e uma segunda amostra de urina. Caso não retorne, agendaremos uma visita de nossa equipe à sua casa, para que a entrevista e a segunda coleta de sangue e de urina dele (a) sejam realizadas em seu domicílio. Isso é importante porque nem sempre é possível confirmar o diagnóstico dessas doenças com as primeiras amostras coletadas. Também aproveitaremos esse segundo momento para coletarmos informações sobre a evolução da doença. A equipe de estudo também vai revisar o prontuário médico dele (a) para obter informações sobre a conduta médica e a evolução da doença. Se os exames do (a) menor de idade pelo (a) qual você é responsável indicarem que ele está com chikungunya, nós o convidaremos para ser avaliado por um médico especialista e antes vamos esclarecer sobre como será essa avaliação. Caso você concorde, exames laboratoriais e de imagem adicionais poderão ser realizados. Por fim, caso o (a) menor de idade pelo (a) qual você é responsável apresente algum sintoma neurológico, como fraqueza, tontura, alteração visual ou auditiva, o convidaremos para ser avaliado por um médico do projeto e esclareceremos sobre como será essa avaliação. Caso você concorde, dependendo da avaliação médica, poderemos sugerir a realização de exames laboratoriais ou de imagem adicionais

Rubrica do investigador: _____ *Rubrica do responsável:* _____

No. de identificação do participante: | | | | | | | |

Confidencialidade: Todas as respostas durante a entrevista e os resultados dos exames serão confidenciais. Apenas você, o (a) menor de idade pelo (a) qual você é responsável, os responsáveis pelos seus cuidados médicos no posto de saúde, o grupo de pesquisadores deste estudo e os Comitês de Ética em Pesquisas terão acesso a estas informações. Ele (a) não será identificado em nenhum relatório ou publicação resultante da pesquisa. Qualquer informação que possa identificá-lo não será divulgada quando os resultados da pesquisa forem apresentados. Entretanto, os profissionais de saúde são obrigados a informar às secretarias de saúde sobre a identificação de casos de dengue, chikungunya e zika. Por isso, se os exames forem positivos para alguma dessas doenças nós teremos que informar os resultados à secretaria de saúde.

Participação Voluntária: A participação do (a) menor de idade pelo (a) qual você é responsável nesta pesquisa é voluntária. Você/ele (a) pode se recusar a participar ou interromper a participação em qualquer momento. A equipe de estudo também pode optar por encerrar a participação dele (a) durante ou no fim da pesquisa. Neste caso, vocês serão avisados. Durante a entrevista, você/ele (a) tem todo o direito de se recusar a responder qualquer pergunta. Também pode se negar a fazer a coleta de sangue, de urina ou de saliva. A recusa em participar de todo ou de parte desta pesquisa não afetará os cuidados médicos e nem haverá prejuízo em suas relações presentes ou futuras com o posto de saúde ou com as instituições envolvidas na pesquisa. Você/ele (a) não será responsável por nenhuma despesa associada com esta pesquisa e não receberá ajuda financeira para participar do estudo, mas será ressarcido por eventuais gastos, como de transporte. Você/ele (a) tem o direito a indenização e assistência integral frente a qualquer dano decorrente da participação na pesquisa. Este termo de consentimento será preenchido em duas vias e você receberá uma das vias.

Grupo de Contato: Se no futuro você/ele (a) tiver qualquer dúvida sobre a participação ou sobre os direitos como participante na pesquisa, por favor, entre em contato com o Dr. Guilherme Ribeiro, Pesquisador do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Rua Waldemar Falcão, 121, Brotas, Salvador, telefones (71) 3176-2281 ou 99624-8838, ou com o Comitê de Ética em Pesquisas, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, Salvador, telefone (71) 3176-2285, e-mail: cep@bahia.fiocruz.br.

Consentimento: Eu entendi este termo de consentimento. Minhas perguntas foram devidamente respondidas. Sendo assim, eu voluntariamente concordo que o (a) menor de idade pelo (a) qual sou responsável participe do estudo e tenha suas amostras de sangue, urina e saliva testadas para Zika, dengue e chikungunya:

Eu concordo: ☐ Sim ☐ Não

Assim como os vírus Zika e chikungunya recentemente chegaram e se disseminaram pelo Brasil, outros vírus transmitidos por mosquitos podem ser introduzidos e se espalhar acometendo muitas pessoas. Por isso, gostaríamos de sua autorização para, se necessário, testarmos no futuro as amostras de sangue, urina e saliva do (a) menor de idade pelo (a) qual você é responsável para outras doenças transmitidas por mosquitos.

Eu concordo: ☐ Sim ☐ Não

Rubrica do investigador: _____ Rubrica do responsável: _____

No. de identificação do participante: | | | | | | | |

Além disso, essa pesquisa pode permitir o estudo de outras doenças infecciosas que causam sintomas semelhantes aos da Zika, dengue e chikungunya. Este não é o objetivo principal dessa pesquisa, mas já que estamos coletando amostras de sangue, urina e saliva, nós temos uma oportunidade de no futuro investigar outras possíveis causas para a doença do (a) menor de idade pelo (a) qual sou responsável e estudar as semelhanças e diferenças entre os sintomas causados por Zika, dengue e chikungunya daqueles sintomas causados por outras doenças. Por isso, nós gostaríamos de pedir sua autorização para no futuro testar essas amostras de sangue, urina e saliva para outras doenças que podem se confundir com a Zika, a dengue e a chikungunya.

Eu voluntariamente concordo que as amostras de sangue, urina e saliva do (a) menor de idade pelo (a) qual sou responsável sejam testados para identificar os agentes infecciosos que causam as seguintes doenças:

Resfriado:	☐ Sim ☐ Não	Dor de garganta:	☐ Sim ☐ Não	Caxumba:	☐ Sim ☐ Não
Gripe:	☐ Sim ☐ Não	Catapora / Varicela:	☐ Sim ☐ Não	Leptospirose:	☐ Sim ☐ Não
Pneumonia:	☐ Sim ☐ Não	Síndrome mão-pé-boca	☐ Sim ☐ Não	Coqueluche:	☐ Sim ☐ Não
Sarampo:	☐ Sim ☐ Não	Toxoplasmose:	☐ Sim ☐ Não		
Roséola:	☐ Sim ☐ Não	Mononucleose:	☐ Sim ☐ Não		
Rubéola:	☐ Sim ☐ Não	Citomegalovírus:	☐ Sim ☐ Não		
Rickettsiose:	☐ Sim ☐ Não	Eritema infeccioso:	☐ Sim ☐ Não		

Assinatura do responsável legal

Data

Hora



Impressão Digital do Participante do Estudo

Assinatura do Investigador

Data

Hora

Assinatura da Testemunha

Data

Hora

ANEXO B - TCLE e TALE AMBULATÓRIO CHIKUNGUNYA

**Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde
Universidade Federal da Bahia
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Acompanhamento de pacientes com chikungunya
(para os participantes maiores de idade)**

Título do Projeto: Arboviroses emergentes: um estudo clínico, epidemiológico e entomológico

Nome do Participante: _____

No. de identificação do participante: _____

Para ser lido por todos os participantes maiores de idade: As informações a seguir descrevem a pesquisa e o seu papel como participante. Por favor, leia com atenção e sinta-se à vontade para tirar qualquer dúvida com o entrevistador.

Objetivo da Pesquisa: Esta é uma pesquisa sobre dengue, chikungunya e zika. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Instituto Gonçalo Moniz, da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, e pela Universidade Federal da Bahia. A dengue, a chikungunya e a zika são grandes problemas de saúde pública em Salvador e no Brasil. O diagnóstico dessas doenças na fase inicial é difícil, pois os sintomas como febre, manchas e dor no corpo são comuns a muitas doenças. Nós te convidamos a participar desta pesquisa porque os resultados dos exames que você realizou sugerem que você teve uma infecção por chikungunya. A infecção pelo vírus da chikungunya pode evoluir para cura ou pode evoluir para dores crônicas nas articulações. Entretanto, não se sabe porque algumas pessoas que tem a infecção melhoram e outras mantêm dores crônicas. O objetivo desta pesquisa é estudar pacientes com infecção por chikungunya para tentar entender melhor quais os sintomas da doença, como ela evolui e porque algumas pessoas desenvolvam dores crônicas. Se você concordar em participar desse estudo, nós te encaminharemos para consulta médica com um especialista no tratamento dessa doença que te acompanhará com consultas periódicas por um ano. Também realizaremos periodicamente exames de sangue, radiografia das mãos, punhos e pés, e se necessário outros exames adicionais. As informações que nós obtivermos poderão ajudar na avaliação médica e tratamento de outros pacientes que desenvolverem chikungunya no futuro. Além disso, é possível que você seja beneficiado diretamente pela sua participação nesta pesquisa, porque durante o acompanhamento com um médico especialista você realizará consultas, realizará exames que ajudarão na avaliação médica e receberá orientações sobre o tratamento da doença.

Procedimentos a serem seguidos: Se você aceitar participar desta pesquisa, após ter lido e entendido este termo de consentimento, um médico especialista te atenderá e fará perguntas a respeito de como você se sente, sobre a história da sua doença atual e sobre outras doenças que você já teve. O médico também realizará um exame físico em você para avaliar como estão suas articulações. Além disso, precisaremos coletar uma amostra de 20 mililitros (1 colher de sopa) do seu sangue. Você pode sentir um pouco de dor no local onde o sangue for coletado e mais raramente pode aparecer uma mancha roxa ou uma infecção no local, mas este risco será reduzido ao mínimo porque um profissional treinado irá realizar a coleta. O sangue será usado para avaliar se a chikungunya está causando inflamação ou outras alterações no seu corpo e para avaliar se alguma alteração encontrada no seu exame pode sugerir como a doença irá se comportar em você (esses exames se chamam exames reumatológicos). Também permitirá sabermos se você tem alguma outra doença que pode influenciar na evolução da infecção pelo vírus chikungunya, como hepatite viral, HIV e HTLV. Além disso, exames de imagem, como raio-X das mãos, punhos, pés, ultrassonografia ou ressonância magnética poderão ser solicitados pelo médico. Você precisará retornar ao ambulatório para uma nova avaliação médica com três, seis e doze meses após a primeira consulta, quando uma nova entrevista, exame físico e coleta de sangue serão realizados. Novos exames de imagem poderão ser solicitados. Nós te ligaremos para te lembrar da data da consulta e caso você não compareça ligaremos para reagendar. A equipe do estudo também vai revisar o seu prontuário médico para obter informações sobre a conduta médica e a evolução de sua doença.

Rubrica do investigador: _____ *Rubrica do participante:* _____

No. de identificação do participante: | | | | | | | |

Confidencialidade: Suas respostas durante a entrevista e os resultados dos seus exames serão confidenciais. Apenas você, os responsáveis pelos seus cuidados médicos, o grupo de pesquisadores deste estudo e os Comitês de Ética em Pesquisas terão acesso a estas informações. Você não será identificado em nenhum relatório ou publicação resultante da pesquisa. Qualquer informação que possa identificá-lo não será divulgada quando os resultados da pesquisa forem apresentados. Entretanto, os profissionais de saúde são obrigados a informar às secretarias de saúde sobre a identificação de casos chikungunya e, por isso, nós teremos que informar à secretaria de saúde que você teve o diagnóstico de chikungunya.

Participação Voluntária: Sua participação nesta pesquisa é voluntária. Você pode se recusar a participar ou interromper sua participação em qualquer momento. A equipe de estudo também pode optar por encerrar sua participação durante ou no fim da pesquisa. Neste caso, você será avisado. Durante a entrevista, você tem todo o direito de se recusar a responder qualquer pergunta. Também pode se negar a fazer o exame físico, a coleta de sangue, ou um exame de imagem. A recusa em participar de todo ou de parte desta pesquisa não afetará seus cuidados médicos e nem haverá prejuízo em suas relações presentes ou futuras com o profissional médico, nem com as instituições envolvidas na pesquisa. Você não será responsável por nenhuma despesa associada com esta pesquisa e não receberá ajuda financeira para participar do estudo, mas será ressarcido por eventuais gastos, como de transporte. Você tem o direito a indenização e assistência integral frente a qualquer dano decorrente da sua participação na pesquisa. Este termo de consentimento será preenchido em duas vias e você receberá uma das vias.

Grupo de Contato: Se no futuro você tiver qualquer dúvida sobre sua participação ou sobre seus direitos como participante na pesquisa, por favor, entre em contato com o Dr. Guilherme Ribeiro, Pesquisador do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Rua Waldemar Falcão, 121, Brotas, Salvador, telefones (71) 3176-2301 ou (71) 3176-2265, ou com o Comitê de Ética em Pesquisas, Instituto Gonçalo Moniz, Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, Salvador, telefone (71) 3176-2285, e-mail: cep.igm@fiocruz.br

Consentimento: Eu entendi este termo de consentimento. Minhas perguntas foram devidamente respondidas. Sendo assim, eu voluntariamente concordo em participar do estudo e ter meu sangue submetido a exames:

Eu concordo: ☐ Sim ☐ Não

Assinatura do participante do estudo

Data

Hora



Impressão Digital do Participante do Estudo

Assinatura do Investigador

Data

Hora

Assinatura da Testemunha

Data

Hora

**Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde
Universidade Federal da Bahia
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Acompanhamento de pacientes com chikungunya
(para os responsáveis legais pelos participantes menores de idade)**

Título do Projeto: Arboviroses emergentes: um estudo clínico, epidemiológico e entomológico

Nome do Participante: _____

No. de identificação do participante: _____

Para ser lido por todos os responsáveis legais pelos participantes menores de idade: As informações a seguir descrevem a pesquisa e o seu papel como participante. Por favor, leia com atenção e sinta-se à vontade para tirar qualquer dúvida com o entrevistador.

Objetivo da Pesquisa: Esta é uma pesquisa sobre dengue, chikungunya e zika. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Instituto Gonçalo Moniz, da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, e pela Universidade Federal da Bahia. A dengue, a chikungunya e a zika são grandes problemas de saúde pública em Salvador e no Brasil. O diagnóstico dessas doenças na fase inicial é difícil, pois os sintomas como febre, manchas e dor no corpo são comuns a muitas doenças. Nós estamos convidando o (a) menor de idade pelo (a) qual você é responsável a participar desta pesquisa porque os resultados dos exames que ele realizou sugerem que ele teve uma infecção por chikungunya. A infecção pelo vírus da chikungunya pode evoluir para cura ou pode evoluir para dores crônicas nas articulações. Entretanto, não se sabe porque algumas pessoas que tem a infecção melhoram e outras mantêm dores crônicas. O objetivo desta pesquisa é estudar pacientes com infecção por chikungunya para tentar entender melhor quais os sintomas da doença, como ela evolui e porque algumas pessoas desenvolvam dores crônicas. Se você concordar, nós encaminharemos o (a) menor de idade pelo (a) qual você é responsável para consulta médica com um especialista no tratamento dessa doença, que o acompanhará com consultas periódicas por um ano. Também realizaremos periodicamente exames de sangue, radiografia das mãos, punhos e pés, e se necessário outros exames adicionais. As informações que nós obtivermos poderão ajudar na avaliação médica e tratamento de outros pacientes que desenvolverem chikungunya no futuro. Além disso, é possível que ele seja beneficiado diretamente pela participação nesta pesquisa, porque durante o acompanhamento com um médico especialista ele realizará consultas, realizará exames que ajudarão na avaliação médica e receberá orientações sobre o tratamento da doença.

Procedimentos a serem seguidos: Se você aceitar participar desta pesquisa, após ter lido e entendido este termo de consentimento, um médico especialista atenderá o (a) menor de idade pelo (a) qual você é responsável e fará perguntas a respeito de como ele se sente, sobre a história da doença atual e sobre outras doenças que ele já teve. O médico também realizará um exame físico para avaliar como estão as articulações dele. Além disso, precisaremos coletar uma amostra de 20 mililitros (1 colher de sopa) do sangue dele. Ele pode sentir um pouco de dor no local onde o sangue for coletado e mais raramente pode aparecer uma mancha roxa ou uma infecção no local, mas este risco será reduzido ao mínimo porque um profissional treinado irá realizar a coleta. O sangue será usado para avaliar se a chikungunya está causando inflamação ou outras alterações no corpo dele e para avaliar se alguma alteração encontrada no exame pode sugerir como a doença irá se comportar em (esses exames se chamam exames reumatológicos). Também permitirá sabermos se ele tem alguma outra doença que pode influenciar na evolução da infecção pelo vírus chikungunya, como hepatite viral, HIV e HTLV. Além disso, exames de imagem, como raio-X das mãos, punhos, pés, ultrassonografia ou ressonância magnética poderão ser solicitados pelo médico. Você precisará trazer o (a) menor de idade pelo (a) qual você é responsável ao ambulatório para uma nova avaliação médica com três, seis e doze meses após a primeira consulta, quando uma nova entrevista, exame físico e coleta de sangue serão realizados. Novos exames de imagem poderão ser solicitados. Nós te ligaremos para te lembrar da data da consulta e caso você não compareça com o (a) menor de idade pelo (a) qual você é responsável ligaremos para reagendar. A equipe do estudo também vai revisar o prontuário médico dele para obter informações sobre a conduta médica e a evolução da doença.

Rubrica do investigador: _____ *Rubrica do participante:* _____

No. de identificação do participante: | | | | | | | |

Confidencialidade: Todas as respostas durante a entrevista e os resultados dos exames serão confidenciais. Apenas você, o (a) menor de idade pelo (a) qual você é responsável, os responsáveis pelos seus cuidados médicos, o grupo de pesquisadores deste estudo e os Comitês de Ética em Pesquisas terão acesso a estas informações. Ele não será identificado em nenhum relatório ou publicação resultante da pesquisa. Qualquer informação que possa identificá-lo não será divulgada quando os resultados da pesquisa forem apresentados. Entretanto, os profissionais de saúde são obrigados a informar às secretarias de saúde sobre a identificação de casos de chikungunya e, por isso, nós teremos que informar à secretaria de saúde que ele teve o diagnóstico de chikungunya.

Participação Voluntária: A participação do (a) menor de idade pelo (a) qual você é responsável nesta pesquisa é voluntária. Você/ele (a) pode se recusar a participar ou interromper a participação em qualquer momento. A equipe de estudo também pode optar por encerrar sua participação durante ou no fim da pesquisa. Neste caso, vocês serão avisados. Durante a entrevista, você/ele tem todo o direito de se recusar a responder qualquer pergunta. Também pode se negar a fazer o exame físico, a coleta de sangue, ou um exame de imagem. A recusa em participar de todo ou de parte desta pesquisa não afetará seus cuidados médicos e nem haverá prejuízo em suas relações presentes ou futuras com o profissional médico, nem com as instituições envolvidas na pesquisa. Você/ele não será responsável por nenhuma despesa associada com esta pesquisa e não receberá ajuda financeira para participar do estudo, mas será ressarcido por eventuais gastos, como de transporte. Você/ele tem o direito a indenização e assistência integral frente a qualquer dano decorrente da sua participação na pesquisa. Este termo de consentimento será preenchido em duas vias e você receberá uma das vias.

Grupo de Contato: Se no futuro você/ele tiver qualquer dúvida sobre a participação ou sobre os direitos como participante na pesquisa, por favor, entre em contato com o Dr. Guilherme Ribeiro, Pesquisador do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Rua Waldemar Falcão, 121, Brotas, Salvador, telefones (71) 3176-2301 ou (71) 3176-2265, ou com o Comitê de Ética em Pesquisas, Instituto Gonçalo Moniz, Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, Salvador, telefone (71) 3176-2285, e-mail: cep.igm@fiocruz.br

Consentimento: Eu entendi este termo de consentimento. Minhas perguntas foram devidamente respondidas. Sendo assim, eu voluntariamente concordo que o (a) menor de idade pelo (a) qual sou responsável participe do estudo e tenha seu sangue submetido a exames:

Eu concordo: ☐ Sim ☐ Não

Assinatura do responsável legal

Data

Hora



Impressão Digital do Participante do Estudo

Assinatura do Investigador

Data

Hora

Assinatura da Testemunha

Data

Hora

APÊNDICE A – ARTIGO REFERENTE A COLABORAÇÃO NO PROJETO DE AVALIAÇÃO DE FATORES DE RISCO PARA CHIKUNGUNYA CRONICA (2021)

Durante o período do doutorado, colaborei em outros 9 trabalhos, nos quais sou primeira autora em 3 deles (sendo um com autoria compartilhada). Seguem abaixo por ordem de publicação:

1 – Artigo referente a colaboração no projeto de avaliação de fatores de risco para chikungunya cronica (2021): <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.03.003>

International Journal of Infectious Diseases 105 (2021) 608–616



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Infectious Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijid



Risk of chronic arthralgia and impact of pain on daily activities in a cohort of patients with chikungunya virus infection from Brazil

Monaíse M.O. Silva^a, Mariana Kikuti^{a,b}, Rosângela O. Anjos^a, Moyra M. Portilho^a, Viviane C. Santos^a, Thaiza S.F. Gonçalves^a, Laura B. Tauro^{a,c}, Patrícia S.S. Moreira^a, **Leile C. Jacob-Nascimento^a**, Perla M. Santana^a, Gúbio S. Campos^d, André M. Siqueira^e, Uriel Kitron^{a,f}, Mitermayer G. Reis^{a,g,h}, Guilherme S. Ribeiro^{a,g,*}

^a Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil
^b Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil
^c Instituto de Biología Subtropical, CONICET-UNAM, Puerto Iguazú, Argentina
^d Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil
^e Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil
^f Emory University, Atlanta, GA, USA
^g Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil
^h Yale School of Public Health, Yale University, New Haven, CT, USA

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 December 2020
Received in revised form 17 February 2021
Accepted 2 March 2021

Keywords:
Chikungunya virus
Chronic arthralgia
Cohort
Risk factor
Disability

ABSTRACT

Objectives: To investigate risk factors for persistent arthralgia in patients with chikungunya, and describe its impact on daily activities.

Methods: From September 2014 to July 2016, a surveillance study enrolled patients with acute febrile illness in Salvador, Brazil, and detected those with chikungunya virus infection using IgM enzyme-linked immunosorbent assay or reverse transcriptase polymerase chain reaction. Telephone follow-ups were performed to ascertain the progression of disease.

Results: Of 153 followed cases, 65 (42.5%) reported chronic arthralgia that lasted >3 months, and 47 (30.7%) were still symptomatic at the time of the interview (approximately 1.5 years after symptom onset). Limitations in daily activities and mental distress were reported by 93.8% and 61.5% of those with chronic arthralgia, respectively. Female sex [risk ratio (RR) 1.79, 95% confidence interval (CI) 1.95–2.69] and age (RR 1.02 for each 1-year increase, 95% CI 1.01–1.03) were independent risk factors for chronic arthralgia. Chronic arthralgia was not associated with co-infection with dengue virus (RR 0.97, 95% CI 0.48–1.94) or chikungunya viral load at diagnosis (median chikungunya virus RNA of 5.60 and 5.52 log₁₀ copies/μL for those with and without chronic arthralgia, respectively; *P* = 0.75).

Conclusions: These findings reinforce the high frequency of chronic chikungunya arthralgia, and highlight the substantial disability associated with the persistence of pain. Development of novel strategies to mitigate the transmission of chikungunya virus and to provide long-term medical assistance for patients with chikungunya are needed urgently.

© 2021 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introduction

The most prominent clinical manifestations of acute chikungunya virus (CHIKV) infection are joint pain and fever (Weaver and Lecuit, 2015). As the disease evolves, the clinical picture is divided didactically into three stages: acute, subacute and chronic (Brasil,

2017; Brito et al., 2016). The acute stage may last up to 10–14 days and is characterized by the presence of fever and polyarthralgia, but other manifestations, such as headache, myalgia, rash, conjunctivitis and joint oedema, are commonly observed. By the end of this period, the symptoms may subside or evolve to a subacute stage, characterized by continued arthralgia. If arthralgia does not remit after 3 months, the disease is classified as chronic, and can then persist for a varied and undefined period. In this stage, arthralgia typically affects multiple joints in a relapsing–remitting or persistent pattern (Weaver and Lecuit, 2015). Other common symptoms of chronic chikungunya include joint stiffness, oedema

* Corresponding author at: Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, 40296-710, Salvador, BA, Brazil.
E-mail address: guilherme.ribeiro@fiocruz.br (G.S. Ribeiro).

APÊNDICE B – ARTIGO REFERENTE AO TRABALHO DESENVOLVIDO DURANTE MESTRADO (2021)

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.744183>



ORIGINAL RESEARCH
published: 01 October 2021
doi: 10.3389/fimmu.2021.744183



Acute-Phase Levels of CXCL8 as Risk Factor for Chronic Arthralgia Following Chikungunya Virus Infection

Leile Camila Jacob-Nascimento¹, Caroline Xavier Carvalho²,
Monsiê Madalena Oliveira Silva¹, Mariana Kikut^{1,3}, Rosângela Oliveira Anjos¹,
Jordana Rodrigues Barbosa Fradico⁴, Ana Carolina Campi-Azevedo⁴,
Laura Beatriz Tauro⁵, Gúbio Soares Campos⁶, Patrícia Sousa dos Santos Moreira⁷,
Moyra Machado Portilho¹, Olindo Assis Martins-Filho⁴, Guilherme Sousa Ribeiro^{1,7†}
and Mitemayer Galvão Reis^{1,7,8†}

OPEN ACCESS

Edited by:
Raymond P. Donnelly,
United States Food and Drug
Administration, United States

Reviewed by:
Mohiaddin Manangeeswaran,
United States Food and Drug
Administration, United States
Karl Ann Shiley,
University of Maryland, United States

*Correspondence:

Mitemayer Galvão Reis
mitemayer.nas@focruz.br

[†]These authors have contributed
equally to this work and
share last authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Cytokines and Soluble
Mediators in Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 19 July 2021

Accepted: 02 September 2021

Published: 01 October 2021

Citation:

Jacob-Nascimento LC, Carvalho CX,
Silva MMA, Kikut M, Anjos RO,
Fradico JRB, Campi-Azevedo AC,
Tauro LB, Campos GS, Moreira PSdS,
Portilho MM, Martins-Filho OA,
Ribeiro GS and Reis MG (2021) Acute-
Phase Levels of CXCL8 as Risk Factor
for Chronic Arthralgia Following
Chikungunya Virus Infection.
Front. Immunol. 12:744183.
doi: 10.3389/fimmu.2021.744183

¹Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil, ²Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro, Brazil, ³Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil, ⁴Instituto René Rachou,
Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brazil, ⁵Instituto de Biologia Subtropical, Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas – Universidad Nacional de Misiones, Puerto Iguazú, Argentina, ⁶Instituto de Ciências da Saúde,
Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil, ⁷Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia,
Salvador, Brazil, ⁸Yale School of Public Health, Yale University, New Haven, CT, United States

The immunopathogenesis of chikungunya virus (CHIKV) infection and the role of acute-phase immune response on joint pain persistence is not fully understood. We investigated the profile of serum chemokine and cytokine in CHIKV-infected patients with acute disease, compared the levels of these biomarkers to those of patients with other acute febrile diseases (OAFD) and healthy controls (HC), and evaluated their role as predictors of chronic arthralgia development. Chemokines and cytokines were measured by flow Cytometric Bead Array. Patients with CHIKV infection were further categorized according to duration of arthralgia (≤ 3 months vs >3 months), presence of anti-CHIKV IgM at acute-phase sample, and number of days of symptoms at sample collection (1 vs 2–3 vs ≥ 4). Patients with acute CHIKV infection had significantly higher levels of CXCL8, CCL2, CXCL9, CCL5, CXCL10, IL-1 β , IL-6, IL-12, and IL-10 as compared to HC. CCL2, CCL5, and CXCL10 levels were also significantly higher in patients with CHIKV infection compared to patients with OAFD. Patients whose arthralgia lasted > 3 months had increased CXCL8 levels compared to patients whose arthralgia did not ($p < 0.05$). Multivariable analyses further indicated that high levels of CXCL8 and female sex were associated with arthralgia lasting >3 months. Patients with chikungunya and OAFD had similar cytokine kinetics for IL-1 β , IL-12, TNF, IFN- γ , IL-2, and IL-4, although the levels were lower for CHIKV patients. This study suggests that chemokines may have an important role in the immunopathogenesis of chronic chikungunya-related arthralgia.

Keywords: chronic arthralgia, chemokines, cytokines, chikungunya, serum biomarkers, cohort

APÊNDICE C – ARTIGO REFERENTE A COLABORAÇÃO NO PROJETO DE INVESTIGAÇÃO DA DIVERSIDADE DE VETORES DE ARBOVIROSES EM UM BAIRRO DA CIDADE DE SALVADOR

<https://doi.org/10.1093/jme/tjac007>

Journal of Medical Entomology, 59(3), 2022, 1065–1070
<https://doi.org/10.1093/jme/tjac007>
 Advance Access Publication Date: 4 March 2022
 Short Communication



ENTOMOLOGICAL
SOCIETY OF AMERICA
SHARING INSECT SCIENCE GLOBALLY



Short Communication

Diversity of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in An Atlantic Forest Urban Park, Salvador, Brazil

Raquel Lima de Souza,^{1,*} Gabriel dos Santos Ferreira,^{1,2,*} Lairton Souza Borja,¹
 Romero de Jesus Nazaré,¹ Válio Andre Mugabe,^{1,3,4} Hernan Dario Argibay,^{1,3}
 Moyra Machado Portilho,¹ Leile Camila Jacob-Nascimento,^{1,5}
 Mitermayer Galvão Reis,^{1,5,6} Uriel D. Kitron,⁷ and Guilherme Sousa Ribeiro^{1,5,8,9}

¹Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia 40296-710, Brazil, ²Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia 40170-115, Brazil, ³Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia 40110-040, Brazil, ⁴Departamento de Ciências e Tecnologia, Universidade Licungo, Quelimane, Zambézia 106, Mozambique, ⁵Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia 40110-100, Brazil, ⁶Department of Epidemiology of Microbial Diseases, Yale School of Public Health, New Haven, CT 06510, USA, ⁷Department of Environmental Sciences, Emory University, Atlanta, GA 30322, USA, and ⁸Corresponding author, e-mail: guilherme.ribeiro@fiocruz.br

*These authors contributed equally for this work.

Subject Editor: Andrew van den Hurk

Received 23 August 2021; Editorial decision 4 January 2022

Abstract

We identified mosquito species (Diptera: Culicidae) in an Atlantic Forest fragment located in a large urban park in Salvador, Brazil, one year after a citywide epizootic of yellow fever virus (YFV). Between May 2 and August 2, 2018, adult mosquitoes were collected using the human attraction method, followed by trapping with hand-nets, and CO₂-baited light traps placed at ground level and in the canopy. We collected a total of 11,914 mosquitoes, which belonged to three tribes, five genera, and at least seven species. The most abundant taxa captured by CO₂-baited light traps were *Culex quinquefasciatus* (Say, Diptera: Culicidae) *Limatus* spp. (Diptera: Culicidae), and *Wyeomyia* spp. (Diptera: Culicidae), while by human attraction, *Cx. quinquefasciatus*, *Wyeomyia* spp., and *Aedes albopictus* (Skuse, Diptera: Culicidae) were captured most often. The diversity of mosquitoes by species was greater in the park area with resting vegetation compared to the area with dense rainforest. Although vectors commonly associated with sylvatic YFV transmission were not captured, we collected several species capable of transmission of other arboviruses. Given the high likelihood of encounters between mosquitoes and human visitors in environments, such as the one studied, periodic entomological surveys to determine the risk of arbovirus transmission in these settings are warranted.

Key words: arbovirus, mosquito, entomological survey, Brazil

In Brazil, dengue (DENV), Zika (ZIKV), and chikungunya (CHIKV) viruses have co-circulated since 2015 (Carvalho et al. 2019). In addition, between late 2016 and mid-2018, Brazil faced the worst human outbreaks and epizootics of sylvatic yellow fever virus (YFV) since the 1940's (Possas et al. 2018). In Salvador, the largest north-eastern city of Brazil, an epizootic of YFV affecting 205 non-human primates (NHPs) of the genus *Callithrix* was reported in 2017 (Paploski et al. 2017). Because the city had been affected by simultaneous epidemics of DENV, CHIKV, and ZIKV (Cardoso et al. 2015, Ribeiro et al. 2018, Silva et al. 2019), there were concerns about the

potential for establishment of an urban human-mosquito cycle of YFV transmission.

Urban areas adjacent to forests, or containing forest remnants, are considered an ideal setting for resurgence of urban YFV transmission (Possas et al. 2018). However, knowledge about mosquito diversity in forested areas located close to (or within) urban residential areas in Brazil is scarce. The recent outbreaks and epizootics of YFV in Brazil, and the detection of the virus transmission among NHPs living in large urban centers such as Salvador, reinforced the need for inventories of mosquito species in urban forest fragments.

APÊNDICE D – ARTIGO REFERENTE A COLABORAÇÃO NO PROJETO DE INVESTIGAÇÃO DE DIAGNÓSTICO DE VIRUS CAUSADORES DE MENINGITES A PARTIR DE FLUIDO CEREBROESPINAL

<https://doi.org/10.3389/ftd.2022.1023588>

 **frontiers** | Frontiers in Tropical Diseases

TYPE Brief Research Report
PUBLISHED 02 November 2022
DOI 10.3389/ftd.2022.1023588



OPEN ACCESS

EDITED BY
Amit Sinha,
New England Biolabs, United States

REVIEWED BY
Antonio C. R. Vallinoto,
Federal University of Pará, Brazil
Hugo Carrillo-Ng,
Nutrition Research Institute (IIN), Peru

*CORRESPONDENCE
Mitermayer G. Reis
mitermayer.reis@fiocruz.br

*PRESENT ADDRESS
Laura B. Tauro,
Subtropical Biology Institute
CONICET-UNaM, Puerto Iguazú,
Misiones, Argentina

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Emerging Tropical Diseases,
a section of the journal
Frontiers in Tropical Diseases

RECEIVED 19 August 2022
ACCEPTED 13 October 2022
PUBLISHED 02 November 2022

CITATION
Dias TT, Tauro LB, Macêdo LEN,
Brito LO, Ribeiro VHO, Santos CS,
Jacob-Nascimento LC, Vilas-Boas LS,
Amado C, Barbosa PS, Reis JN,
Campos GS, Ribeiro GS, Siqueira IC,
Silva LK and Reis MG (2022) The
emergence of arboviruses changes the
profile of viral meningitis in Salvador,
Bahia: A case series.
Front. Trop. Dis. 3:1023588.
doi: 10.3389/ftd.2022.1023588

COPYRIGHT
© 2022 Dias, Tauro, Macêdo, Brito,
Ribeiro, Santos, Jacob-Nascimento,
Vilas-Boas, Amado, Barbosa, Reis,
Campos, Ribeiro, Siqueira, Silva and
Reis. This is an open-access article
distributed under the terms of the
Creative Commons Attribution License
(CC BY). The use, distribution or
reproduction in other forums is
permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s)
are credited and that the original
publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does
not comply with these terms.

The emergence of arboviruses changes the profile of viral meningitis in Salvador, Bahia: A case series

Tamiris T. Dias^{1,2}, Laura B. Tauro^{1†}, Lara E. N. Macêdo^{1,3},
Liz O. Brito^{1,3}, Victor H. O. Ribeiro⁴, Cleiton S. Santos⁵,
Leile C. Jacob-Nascimento[†], Letícia S. Vilas-Boas⁴,
Caio Amado⁴, Paula S. Barbosa¹, Joice N. Reis^{1,6},
Gubio Soares Campos⁷, Guilherme S. Ribeiro^{1,4},
Isadora C. Siqueira⁵, Luciano K. Silva¹
and Mitermayer G. Reis^{1,4,8*}

¹Pathology and Molecular Biology Laboratory, Gonçalo Moniz Institute (IGM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Salvador, BA, Brazil, ²Clinical Analysis Laboratory, Professor Edgard Santos University Hospital, Federal University of Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brazil, ³School of Biomedicine, Bahiana School of Medicine and Public Health, Salvador, BA, Brazil, ⁴School of Medicine, UFBA, Salvador, BA, Brazil, ⁵Experimental Pathology Laboratory, IGM, Fiocruz, Salvador, BA, Brazil, ⁶School of Pharmacy, UFBA, Salvador, BA, Brazil, ⁷Health Science Institute, UFBA, Salvador, BA, Brazil, ⁸School of Public Health, Yale University, New Haven, CT, United States

Background: Recently, different arboviruses became endemic in Brazil mostly causing acute febrile illnesses, however, neurological manifestations have also been reported. This study aimed to investigate which viruses were involved in the meningitis etiology and the contribution of the circulating arboviruses in Salvador, Bahia, Brazil.

Methods: From June 2014 to February 2016, 170 patients with suspected viral meningitis were identified in Couto Maia Hospital, Salvador-BA, Brazil. Their CSF samples were investigated for possible viral etiology by reverse transcription-PCR (RT-PCR) for different arboviruses: DENV, ZIKV and CHIKV; and for the EV; and by PCR for the HHV1-5 complex (HSV1-2, VZV, EBV and CMV). Also, ELISA was carried out in a subgroup of remaining samples for detection of DENV IgM and NS1 antigen, CHIKV IgM and ZIKV IgM.

Results: Thirty-seven patients were PCR or ELISA positive for at least one of the studied viruses (overall positivity 21.8%). EV was the agent most frequently detected (10 cases; 27.0%), along with all four DENV serotypes (10 cases; 27.0%); followed by CHIKV (6 cases; 16.2%), ZIKV (6 cases; 16.2%), and Varicella zoster virus (VZV) (1 case; 2.7%). Four cases (10.8%) presented viral co-infection detected: DENV1 + CHIKV, DENV1 + EV, DENV4 + ZIKV, and CHIKV + ZIKV. Arboviruses (DENV, CHIKV and ZIKV) accounted for the great majority of cases (26 cases; 70.3%) of all single and co-infections: DENV has been the most frequently detected arbovirus (13 cases; 35.1%). Among non-arboviral meningitis, the most common etiology was the EV (11 cases; 29.7%).

APÊNDICE E – ARTIGO REFERENTE A COLABORAÇÃO NO PROJETO DE INVESTIGAÇÃO DENSIDADE DE VETORES E CRIADOUROS DE ARBOVÍRUS

<https://doi.org/10.1186/s13071-023-05766-5>

Souza et al. *Parasites & Vectors* (2023) 16:159
<https://doi.org/10.1186/s13071-023-05766-5>

Parasites & Vectors

RESEARCH

Open Access

Density of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in a low-income Brazilian urban community where dengue, Zika, and chikungunya viruses co-circulate



Raquel L. Souza¹, Romero J. Nazare¹, Hernan D. Argibay^{1,2}, Maysa Pellizzaro^{1,2}, Rosângela O. Anjos¹, Moyra M. Portilho¹, **Leile Camila Jacob-Nascimento^{1,4}**, Mitermayer G. Reis^{1,2,3}, Uriel D. Kitron⁴ and Guilherme S. Ribeiro^{1,2*}

Abstract

Background Low-income urban communities in the tropics often lack sanitary infrastructure and are overcrowded, favoring *Aedes aegypti* proliferation and arboviral transmission. However, as *Ae. aegypti* density is not spatially homogeneous, understanding the role of specific environmental characteristics in determining vector distribution is critical for planning control interventions. The objectives of this study were to identify the main habitat types for *Ae. Aegypti*, assess their spatial densities to identify major hotspots of arbovirus transmission over time and investigate underlying factors in a low-income urban community in Salvador, Brazil. We also tested the field-collected mosquitoes for arboviruses.

Methods A series of four entomological and socio-environmental surveys was conducted in a random sample of 149 households and their surroundings between September 2019 and April 2021. The surveys included searching for potential breeding sites (water-containing habitats) and for *Ae. aegypti* immatures in them, capturing adult mosquitoes and installing ovitraps. The spatial distribution of *Ae. aegypti* density indices were plotted using kernel density-ratio maps, and the spatial autocorrelation was assessed for each index. Visual differences on the spatial distribution of the *Ae. aegypti* hotspots were compared over time. The association of entomological findings with socio-ecological characteristics was examined. Pools of female *Ae. aegypti* were tested for dengue, Zika and chikungunya virus infection.

Results Overall, 316 potential breeding sites were found within the study households and 186 in the surrounding public spaces. Of these, 18 (5.7%) and 7 (3.7%) harbored a total of 595 and 283 *Ae. aegypti* immatures, respectively. The most productive breeding sites were water storage containers within the households and puddles and waste materials in public areas. Potential breeding sites without cover, surrounded by vegetation and containing organic matter were significantly associated with the presence of immatures, as were households that had water storage containers. None of the entomological indices, whether based on immatures, eggs or adults, detected a consistent pattern of vector clustering in the same areas over time. All the mosquito pools were negative for the tested arboviruses.

*Correspondence:
 Guilherme S. Ribeiro
guilherme.ribeiro@fiocruz.br
 Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

APÊNDICE F – ARTIGO REFERENTE A COLABORAÇÃO EM TRABALHO QUE AVALIOU A DINÂMICA DE TRANSMISSÃO DO VÍRUS CHIKUNGUNYA NO BRASIL COM DADOS DE PACIENTES SEGUIDOS EM UMA COORTE NA CIDADE DE SALVADOR

<http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011863>

PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

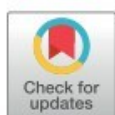
RESEARCH ARTICLE

Dynamics of chikungunya virus transmission in the first year after its introduction in Brazil: A cohort study in an urban community

Rosângela O. Anjos¹, Moyra M. Portilho¹, **Leile Camila Jacob-Nascimento¹**, Caroline X. Carvalho¹, Patricia S. S. Moreira¹, Gielson A. Sacramento¹, Nivison R. R. Nery Junior^{1,2}, Daiana de Oliveira⁴, Jaqueline S. Cruz¹, Cristiane W. Cardoso³, Hernan D. Argibay^{1,2}, Kenneth S. Plante⁴, Jessica A. Plante⁴, Scott C. Weaver⁴, Uriel D. Kitron⁵, Mitermayer G. Reis^{1,6,7}, Albert I. Ko^{1,7}, Federico Costa^{1,2,7,8,9}, Guilherme S. Ribeiro^{1,6*}

1 Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil, **2** Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil, **3** Secretaria Municipal de Saúde de Salvador, Salvador, Brazil, **4** World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, United States of America, **5** Emory University, Atlanta, Georgia, United States of America, **6** Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil, **7** Yale University, New Haven, Connecticut, United States of America, **8** University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom, **9** Lancaster University, Lancaster, United Kingdom

* guilherme.ribeiro@fiocruz.br



OPEN ACCESS

Citation: Anjos RO, Portilho MM, Jacob-Nascimento LC, Carvalho CX, Moreira PSS, Sacramento GA, et al. (2023) Dynamics of chikungunya virus transmission in the first year after its introduction in Brazil: A cohort study in an urban community. *PLoS Negl Trop Dis* 17(12): e0011863. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011863>

Editor: Brett M. Forshey, US Department of Homeland Security, UNITED STATES

Received: March 16, 2023

Accepted: December 14, 2023

Published: December 27, 2023

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011863>

Copyright: © 2023 Anjos 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.

Abstract

Background

The first chikungunya virus (CHIKV) outbreaks during the modern scientific era were identified in the Americas in 2013, reaching high attack rates in Caribbean countries. However, few cohort studies have been performed to characterize the initial dynamics of CHIKV transmission in the New World.

Methodology/Principal findings

To describe the dynamics of CHIKV transmission shortly after its introduction in Brazil, we performed semi-annual serosurveys in a long-term community-based cohort of 652 participants aged ≥ 5 years in Salvador, Brazil, between Feb-Apr/2014 and Nov/2016-Feb/2017. CHIKV infections were detected using an IgG ELISA. Cumulative seroprevalence and sero-incidence were estimated and spatial aggregation of cases was investigated. The first CHIKV infections were identified between Feb-Apr/2015 and Aug-Nov/2015 (incidence: 10.7%) and continued to be detected at low incidence in subsequent surveys (1.7% from Aug-Nov/2015 to Mar-May/2016 and 1.2% from Mar-May/2016 to Nov/2016-Feb/2017). The cumulative seroprevalence in the last survey reached 13.3%. It was higher among those aged 30–44 and 45–59 years (16.1% and 15.6%, respectively), compared to younger (12.4% and 11.7% in <15 and 15–29 years, respectively) or older (10.3% in ≥ 60 years) age groups, but the differences were not statistically significant. The cumulative seroprevalence was similar between men (14.7%) and women (12.5%). Yet, among those aged 15–29 years, men were more often infected than women (18.1% vs. 7.4%, respectively, $P = 0.01$), while for those aged 30–44, a non-significant opposite trend was observed (9.3% vs. 19.0%,

APÊNDICE G – ARTIGO REFERENTE A INVESTIGAÇÃO DE AMOSTRAS DE FLUIDO ORAL E URINA COMO ALTERNATIVA AO DIAGNÓSTICO DE CHIKV

<https://doi.org/10.3390/v1602023>



viruses



Article

Detection of Chikungunya Virus RNA in Oral Fluid and Urine: An Alternative Approach to Diagnosis?

Leile Camila Jacob-Nascimento ^{1,2}, Moyra M. Portilho ¹, Rosângela O. Anjos ¹, Patrícia S. S. Moreira ¹, Christine Stauber ³, Scott C. Weaver ⁴, Uriel Kitron ⁵, Mitermayer G. Reis ^{1,2,6} and Guilherme S. Ribeiro ^{1,2,*}

- ¹ Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador 40296-710, Brazil; biotecamila@gmail.com (L.C.J.-N.); moyra.portilho@hotmail.com (M.M.P.); rosaa.oliveira@hotmail.com (R.O.A.); patimoreira@live.com (P.S.S.M.); mitermayer.reis@fiocruz.br (M.G.R.)
- ² Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, Salvador 40026-010, Brazil
- ³ School of Public Health, Georgia State University, Atlanta, GA 30303, USA; cstauber@gsu.edu
- ⁴ Department of Microbiology & Immunology and World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX 77555, USA; sweaver@utmb.edu
- ⁵ Department of Environmental Sciences, Emory University, Atlanta, GA 30322, USA; ukitron@emory.edu
- ⁶ Yale School of Public Health, Yale University, New Haven, CT 06520-8034, USA

* Correspondence: guilherme.ribeiro@fiocruz.br



Citation: Jacob-Nascimento, L.C.; Portilho, M.M.; Anjos, R.O.; Moreira, P.S.S.; Stauber, C.; Weaver, S.C.; Kitron, U.; Reis, M.G.; Ribeiro, G.S. Detection of Chikungunya Virus RNA in Oral Fluid and Urine: An Alternative Approach to Diagnosis? *Viruses* **2024**, *16*, 235. <https://doi.org/10.3390/v16020235>

Academic Editors: Giulietta Venturi, Claudia Fortuna and Giulia Marsili

Received: 28 December 2023

Revised: 19 January 2024

Accepted: 24 January 2024

Published: 2 February 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: To evaluate whether oral fluids (OF) and urine can serve as alternative, non-invasive samples to diagnose chikungunya virus (CHIKV) infection via RT-qPCR, we employed the same RNA extraction and RT-qPCR protocols on paired serum, OF and urine samples collected from 51 patients with chikungunya during the acute phase of the illness. Chikungunya patients were confirmed through RT-qPCR in acute-phase sera (N = 19), IgM seroconversion between acute- and convalescent-phase sera (N = 12), or IgM detection in acute-phase sera (N = 20). The controls included paired serum, OF and urine samples from patients with non-arbovirus acute febrile illness (N = 28) and RT-PCR-confirmed dengue (N = 16). Nine (47%) of the patients with positive RT-qPCR for CHIKV in sera and two (17%) of those with CHIKV infection confirmed solely via IgM seroconversion had OF positive for CHIKV in RT-qPCR. One (5%) patient with CHIKV infection confirmed via serum RT-qPCR was positive in the RT-qPCR performed on urine. None of the negative control group samples were positive. Although OF may serve as an alternative sample for diagnosing acute chikungunya in specific settings, a negative result cannot rule out an infection. Further research is needed to investigate whether OF and urine collected later in the disease course when serum becomes RT-qPCR-negative may be helpful in CHIKV diagnosis and surveillance, as well as to determine whether urine and OF pose any risk of CHIKV transmission.

Keywords: chikungunya; RT-qPCR; molecular diagnosis; urine; oral fluid

1. Introduction

Chikungunya virus (CHIKV) is an alphavirus of the *Togaviridae* family. It was first detected near the border between Tanzania and Mozambique in 1952 [1,2]. In urban areas, *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes are the main vectors [3,4]. The autochthonous transmission of CHIKV in the Americas was first identified in the Caribbean region in 2013 [5]. Since then, CHIKV has spread across the American continents, causing multiple outbreaks and becoming a public health challenge in these regions of the world [6–17]. Brazil, where the first cases of chikungunya were detected in 2014, has been the most affected country in the Americas, with more than 1.6 million cases reported [16].

In humans, CHIKV infection can evolve asymptotically or cause acute disease manifested by fever, headache, fatigue, myalgia, skin rash, joint swelling and especially arthralgia, which can be severe and last for months to years [14,18]. The diagnosis of chikungunya during its acute phase is based on clinical criteria, epidemiological data

APÊNDICE H – ARTIGO REFERENTE À CONTRIBUIÇÃO NO TRABALHO QUE INVESTIGOU O IMPACTO DA CHIKUNGUNYA NA SAÚDE MENTAL E NAS ATIVIDADES LABORAIS

<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0149-2024>

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine

Vol.:57 | (e00716-2024) | 2024

<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0149-2024>

Short Communication

Chikungunya chronic arthralgia: impact on general and mental health and absenteeism from work

**Lorena Gomes Santos^[1], Leile Camila Jacob-Nascimento^{[1],[2]}, Rosângela Oliveira Anjos^[2],
Moyra Machado Portilho^[2], Viviane Machicado Cavalcante^[3], Adriane Souza Paz^[3],
Mittermayer Barreto Santiago^[3], Cristiane Wanderley Cardoso^{[2],[4]},
Mittermayer Galvão Reis^{[1],[2]} and Guilherme Sousa Ribeiro^{[1],[2]}**

[1]. Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

[2]. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, BA, Brasil.

[3]. Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, BA, Brasil.

[4]. Secretaria Municipal de Saúde de Salvador, Centro de Informações Estratégicas em Vigilância em Saúde, Salvador, BA, Brasil.

ABSTRACT

Background: This study investigated the self-rated general health, mental health, and work absenteeism among patients with laboratory-confirmed chikungunya.

Methods: Telephone interviews were conducted with 63 patients ≥ 22 months after infection.

Results: Patients who reported (N=42) or did not report (N=21) chronic arthralgia, defined by duration ≥ 90 days, had different frequencies for low scores for general health (68.3% vs. 30.0%, respectively; prevalence ratio, 95% confidence interval: 2.3, 1.1-4.6), symptoms of depression (31.7% vs. 15.0%; 2.1, 0.7-6.6), symptoms of anxiety (43.9% vs. 35.0%; 1.3, 0.6-2.5), and work absenteeism (76.5% and 40.0%; 1.9, 0.9-4.2).

Conclusions: Chikungunya chronic arthralgia impacts long-term health and work.

Keywords: Chikungunya. Arthralgia. Health assessment. Mental Health. Work Absenteeism.

APÊNDICE I – NESTE ARTIGO, DISCUTIMOS OS POSSÍVEIS IMPACTOS DA DETECÇÃO DE RNA DE DENV EM URINA E FLUIDO ORAL NA VIGILÂNCIA DE ÁGUAS RESIDUAIS

Submetido ao Brazilian Journal of Infectious Diseases – Primeira Autoria compartilhada

Braz J Infect Dis. 29 (2025) 104484

Contents lists available at ScienceDirect

Brazilian Journal of Infectious Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bjid

 **Sociedade Brasileira de Infectologia**



Brief Communication

Presence of dengue virus RNA in urine and oral fluid of laboratory-confirmed dengue patients: Implications for wastewater surveillance

Christine Stauber ^{a,1}, **Leile Camila Jacob-Nascimento ^{b,c,1}**, Caroline Grosch ^a,
Moisés da Silva Sousa ^b, Moyra M. Portilho ^b, Rosângela O. Anjos ^b, Margo A. Brinton ^d,
Uriel Kitron ^e, Mitermayer G. Reis ^{b,c,f}, Guilherme S. Ribeiro ^{b,c,e}

^a Georgia State University, School of Public Health, Atlanta, USA
^b Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, BA, Brazil
^c Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina da Bahia, Salvador, BA, Brazil
^d Georgia State University, College of Arts and Sciences, Department of Biology, Atlanta, USA
^e Emory University, Department of Environmental Sciences, Atlanta, USA
^f Yale University, Yale School of Public Health, New Haven, USA

ARTICLE INFO

Keywords:
Epidemiology
Dengue virus
Wastewater-based epidemiology

ABSTRACT

Introduction: Dengue cases in the Americas in 2024 have reached record highs, especially in Brazil. However, surveillance remains suboptimal and new methods are needed to monitor Dengue Virus (DENV) spread. To assess whether wastewater-based epidemiology would be a useful tool, we investigated the presence of DENV RNA in dengue patients' urine and oral fluid from an endemic area to inform how shedding in these fluids occurs and provide insight for wastewater surveillance.

Methods: We examined how often DENV RNA is detected in urine and oral fluid from dengue patients confirmed by serum RT-qPCR, NS1 ELISA or IgM seroconversion in Salvador, Brazil.

Results: Of 88 confirmed cases, 9.1 % were positive for DENV RNA in urine (7/88) or oral fluid (1/88). Of 53 serum RT-qPCR-positive patients, 6 (11.3 %) showed detectable DENV RNA in acute- or convalescent-phase urine. Patients with RT-qPCR-positive urine had a lower frequency of DENV IgG in acute-phase serum (a proxy for secondary infection) (57 % vs. 74 %) and a lower median serum RT-qPCR cycle threshold than those with negative urine (21.8 vs. 23.9).

Conclusion: The low presence of DENV RNA in urine suggests that additional research is needed to evaluate whether using wastewater-based epidemiology to monitor DENV transmission is possible.