

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

João Ciro Fagundes Neto

**VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE CHIKUNGUNYA EM HUMANOS E
VETORES: PROPOSTA DE MODELO PARA O MUNICÍPIO DE NATAL-RN**

NATAL-RN

2017

JOÃO CIRO FAGUNDES NETO

**VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE CHIKUNGUNYA EM HUMANOS E
VETORES: PROPOSTA DE MODELO PARA O MUNICÍPIO DE NATAL-RN**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, para obtenção do Título de Mestre em Biologia Parasitária na área de Virologia.

Orientador: Prof. Dr. Josélio Maria Galvão de Araújo.

Co-orientador: Dra. Renata Antonaci Gama.

NATAL-RN

2017

Catálogo da Publicação na Fonte UFRN/ Biblioteca Setorial do Biociências

Fagundes Neto, João Ciro.

Vigilância epidemiológica de Chikungunya em humanos e vetores: proposta de modelo para o município de Natal-RN / João Ciro Fagundes Neto. – 2017.

65 f.: .il

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande Norte, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária. Natal / RN, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Josélio Maria Galvão de Araújo.

Coorientadora: Profa. Dra. Renata Antonaci Gama.

1. Arboviroses – Dissertação 2. Chikungunya - Dissertação. 3. Vigilância epidemiológica – Dissertação. I. Araújo, Josélio Maria Galvão II. Gama, Renata Antonaci. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BCZM
578.833.1

CDU

Elaborado por Kátia Rejane da Silva – CRB 15/351

JOÃO CIRO FAGUNDES NETO

**VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE CHIKUNGUNYA EM HUMANOS E
VETORES: PROPOSTA DE MODELO PARA O MUNICÍPIO DE NATAL-RN**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, para obtenção do Título de Mestre em Biologia Parasitária na área de Virologia.

Aprovado em
24/02/2017

MEMBROS DA BANCA:

Externo à Instituição – PROF. DR. HECTOR G. ROMERO BRUNETTO – Urep

Presidente – PROF. DR. JOSELIO MARIA GALVAO DE ARAUJO – UFRN

Externo ao Programa – PROF. DR. LEONARDO CAPISTRANO FERREIRA – UFRN

Interno - 1715271 - RENATA ANTONACI GAMA -UFRN

NATAL-RN

2017

"O verdadeiro sábio é aquele que assim se dispõe que os acontecimentos exteriores o alterem minimamente. Para isso precisa couraçar-se cercado-se de realidades mais próximas de si do que os fatos, e através das quais os fatos, alterados para de acordo com elas, lhe chegam."

"Tudo vale a pena, quando a alma não é pequena"

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela capacidade de experimentar o belo da vida em todas as suas nuances.

A minha mãe e ao meu irmão por nunca me abandonarem nos momentos mais difíceis.

Aos meus familiares e amigos que por sinal são infindáveis.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Josélio Araújo e Profa. Dra. Renata Antonaci por não terem desistido de mim e, juntamente com todos os meus professores, compartilharam seus conhecimentos. Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Biociências.

Aos colegas de laboratório e de trabalho, meus Chefes de Departamento e do Centro de Controle de Zoonoses.

Aos funcionários do Instituto de Medicina Tropical do Rio Grande do Norte.

Aos funcionários do Centro de Controle de Zoonoses de Natal/RN.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a elaboração desse trabalho.

A todos que me orgulham por fazer parte da vida deles.

Aos que sabem que tenho uma gratidão impagável e não precisam de agradecimento.

Aos que me ensinaram que a vida é curta para que a tornemos pequena.

Obrigado Kíki e Tatá, por estarem nas minhas saudades, Bubu e Tuta por estarem nos meus dias.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo de vigilância de arbovírus em humanos e vetores no município de Natal-RN. Foram estudados culicídeos e casos humanos com sinais e sintomas compatíveis com infecção por arbovírus, recebidos durante o período de fevereiro a julho de 2016, provenientes de busca ativa feita pela equipe de vigilância epidemiológica do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do Município de Natal. O RNA viral foi extraído utilizando o kit QIAamp Viral. A pesquisa dos Chikungunya foi realizada através da técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (Sistema TaqMan®). Foram estudados 104 casos humanos. Um total de 57 (54,8%) casos foram positivos para Chikungunya. Nas amostras de vetores, um total de 816 fêmeas foram estudadas, sendo 421 (51,59%) *Aedes aegypti*, 312 *Aedes albopictus* (38,23%), 56 (6,86%) *Wyeomyia spp*, 23 (2,81%) *Culex quinquefasciatus*, 3 (0,36%) *Ochlerotatus scapularis* e 1 (0,12%) *Haemagogus leucocelaenus*. Um total de 5 pools de *Aedes aegypti* foram positivos para Chikungunya, representando uma Taxa de Infecção Mínima (MIR) igual a 11,87. Na mesma análise, um total de 2 pools de *Aedes albopictus* foram positivas para Chikungunya (MIR = 6,41). Foi possível detectar o vírus Chikungunya em 1 pool de *Wyeomyia spp* (MIR = 17,85). O CHIKV não foi identificado nos pools das espécies *Ochlerotatus scapularis* e *Haemagogus leucocelaenus*. O modelo de vigilância de arbovírus em humanos e vetores proposto por esse trabalho forneceu informações precisas ao Centro de Controle de Zoonoses de Natal-RN sobre os locais com maior circulação de arbovírus e presença de vetores. Essas informações permitiram direcionar ações locais de controle vetorial e contribuíram para a redução do impacto da epidemia de CHIKV no Município de Natal durante o ano de 2016.

Palavras-chave: Arboviroses; *Alphavirus*; Chikungunya; *Aedes sp.*; Vigilância epidemiológica.

ABSTRACT

The objective of this work was to develop a model for surveillance of arboviruses in humans and vectors in the city of Natal, State of Rio Grande do Norte. Culicidae and human cases with signs and symptoms compatible with arbovirus infection were studied. The samples were received from February to July 2016, from an active search carried out by the epidemiological surveillance team of the Center for Zoonoses Control (CCZ) of the Municipality of Natal. Viral RNA was extracted using the QIAamp Viral kit. The research of the Chikungunya was carried out using the reverse transcription technique followed by the real-time polymerase chain reaction (TaqMan[®] System). A total of 104 human cases were studied and 57 (54.8%) of cases were positive for Chikungunya. In the vector fields, a total of 816 were studied, being 421 (51.59%) *Aedes aegypti*, 312 *Aedes albopictus* (38.23%), 56 (6.86%) *Wyeomyia spp.*, 23 (2.81%) *Culex quinquefasciatus*, 3 (0.36%) *Ochlerotatus scapularis* and 1 (0.12%) *Haemagogus leucocelaenus*. A total of 5 *Aedes aegypti* pools were positive for Chikungunya, representing a Minimum Infection Rate (MIR) of 11.87. In the same analysis, a total of 2 pools of *Aedes albopictus* were positive for Chikungunya (MIR = 6.41). It was possible to detect the Chikungunya virus in 1 pool of *Wyeomyia spp* (MIR = 17.85). CHIKV was not identified in pools of *Ochlerotatus scapularis* and *Haemagogus leucocelaenus* species. The arbovirus surveillance model in humans and vectors proposed by this study provided the Natal Zoonoses Control Center with precise information about the places with the greatest circulation of arboviruses and the presence of vectors. This information allows directing local vector control actions and contributed to reducing the impact of the CHIKV outbreak in the city of Natal-RN during 2016.

Keywords: Arboviruses; *Alphavirus*; Chikungunya; *Aedes sp.*; Epidemiological surveillance.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	Proteína do Capsídeo
CHIKV	Vírus Chinkungunya
DENV	Vírus Dengue
DS Norte I	Distrito Sanitário Norte I
DS Norte II	Distrito Sanitário Norte II
DS Leste	Distrito Sanitário Leste
DS Oeste	Distrito Sanitário Oeste
DS Sul	Distrito Sanitário Sul
E	Proteína do envelope
ECSA	Genótipo Centro-Leste-Sul-Africano
IOL	Linhagem Oceano Índico
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
INF- γ	Interferon Gama
NS1	Proteína não-estrutural 1

NS2	Proteína não-estrutural 2
NS3	Proteína não-estrutural 3
NS4	Proteína não-estrutural 4
NS5	Proteína não-estrutural 5
prM	Proteína da pré-membrana
qRT-PCR	Transcrição reversa seguida pela ação em cadeia da polimerase em tempo real
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido Ribonucléico
SBF	Soro fetal bovino
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VPP	Valor preditivo positivo
ZIKV	Vírus Zika

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura do vírus Chikungunya.
- Figura 2. Organização genômica e produtos gênicos do vírus Chikungunya.
- Figura 3. Biossíntese do vírus Chikungunya.
- Figura 4. Análise filogenética do vírus Chikungunya, mostrando as quatro linhagens do vírus: Leste-Central-Sul Africano (ECSA), Oeste Africana, Asiática e Oceano Índico.
- Figura 5. Ciclo epidemiológico do vírus Chikungunya na África.
- Figura 6. Casos prováveis de febre de Chikungunya, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2015 e 2016.
- Figura 7. Incidência de febre de Chikungunya por município de residência em 2016 no Brasil.
- Figura 8. Divisão de bairros de Natal-RN em Distritos Sanitários.
- Figura 9. Perfil de amplificação dos vírus Chikungunya neste estudo através da técnica de RT-PCR em tempo real (Sistema TaqMan).
- Figura 10. Mapa em Kernel mostrando a evolução do CHIKV em humanos e vetores e densidade de ovos de *Aedes sp.* no Município de Natal-RN.
- Figura 11. Mapa em Kernel mostrando os resultados deste estudo, a densidade de ovos de *Aedes sp.*, humanos e mosquitos infectados por CHIKV no Município de Natal-RN.
- Figura 12. Perfil de epidemias para arboviroses notificadas no município de Natal-RN.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Febre Chikungunya.....	13
1.2. Vírus Chikungunya.....	14
1.3. Aspectos imunológicos da Febre Chikungunya.....	18
1.4. Vetores.....	19
1.5. Epidemiologia da Chikungunya no Brasil.....	21
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Objetivo Geral.....	24
2.2. Objetivos Específicos.....	24
3. METODOLOGIA.....	25
3.1. Amostras Estudadas.....	25
3.1.1. Área de estudo.....	25
3.1.2. Coleta de amostras humanas e aspectos éticos.....	26
3.1.3. Coleta de amostras entomológicas.....	26
3.1.3.1. Coleta de mosquitos imaturos.....	26
3.1.3.2. Coleta e preparo de mosquitos adultos.....	27
3.2. Extração de RNA viral.....	28
3.3. Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) para pesquisa do vírus Chikungunya.....	28
3.4. Análise espacial.....	28
3.5. Modelo tradicional de intervenção para o controle de vetores a ser comparado com o modelo atualmente executado	30
3.6. Modelo inovador de vigilância epidemiológica para intervenção e bloqueio de arboviroses em Natal	34
3.7. Análise estatística.....	37
4. RESULTADOS.....	38
4.1. Busca ativa de pacientes humanos com sintomatologia sugestiva de Arbovírus no município de Natal-RN.....	38
4.2. Abundância Vetorial no Município de Natal-RN.....	39
4.3. Pesquisa do Vírus Chikungunya no Município de Natal-RN.....	39
4.4. Análise espacial dos humanos e vetores infectados por CHIKV.....	43
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÃO.....	55
7. REFERÊNCIAS.....	56

8. ANEXOS.....64

1. INTRODUÇÃO

Os arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes e são assim designados não somente pela sua veiculação através de artrópodes, mas, principalmente, pelo fato de parte de seu ciclo replicativo ocorrer nos insetos. São transmitidos aos seres humanos e outros animais pela picada de artrópodes hematófagos.

Os arbovírus que causam doenças em humanos e outros animais de sangue quente são membros de cinco famílias virais: *Bunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*. De acordo com Cleton *et al.* (2012) e Rosenberg *et al.* (2013), estima-se que haja mais de 545 espécies de arbovírus, dentre as quais, mais de 150 relacionadas com doenças em seres humanos, sendo a maioria zoonótica. Essas têm se tornado importantes e constantes ameaças em regiões tropicais devido às rápidas mudanças climáticas, desmatamentos, migração populacional, ocupação desordenada de áreas urbanas, precariedade das condições sanitárias que favorecem a amplificação e transmissão viral (RUST *et al.*, 2012).

Goodman *et al.* (2014), cita que infecções por arbovírus podem apresentar sintomas clínicos semelhantes aos de outras infecções bacterianas ou virais, tais como uma doença semelhante à gripe, encefalite ou poliomielite. Além disso, dentro de um mesmo sorocomplexo de arbovirose, pode haver síndromes de doenças semelhantes, podendo ser clinicamente indistinguíveis umas das outras. O diagnóstico laboratorial é necessário para identificar as infecções por arbovírus e diferenciar entre outros patógenos bacterianos ou virais (JOHNSON *et al.*, 2005).

Neste estudo, apresentamos os resultados de um modelo de vigilância epidemiológica de arbovírus no Município de Natal-RN, realizado durante o ano de 2016, com maior ênfase na Febre Chikungunya, doença de maior importância epidemiológica no período deste estudo.

1.1. Febre Chikungunya

O termo "Chikungunya" é derivado da expressão na língua Makonde para "aquele que se dobra" ou "com muita dor que se arqueia" (SURANJITH *et al.*, 2007). Após a infecção com o vírus Chikungunya, há um período de incubação que dura de dois a quatro dias em média (LAN *et al.*, 2001). O início clínico é abrupto, com alta

febre, dor de cabeça, dor nas costas, mialgia e artralgia, podendo ser este último, muito intensificado, acometendo principalmente as extremidades (tornozelos, pulsos e falanges), além das grandes articulações (ROBINSON, 1955; LAN et al., 2001; SAXENA et al., 2006; QUATRESONS et al., 2006). O acometimento da pele está presente em cerca de 40 a 50% dos casos, e consiste de uma pruriginosa erupção maculopapular, predominantemente no tórax, o edema facial e em crianças, uma erupção bolhosa com descamação acentuada, e localizada, podendo apresentar petéquias e gengivorragia (principalmente nas crianças) (FOURIE et al., 1979; BRIGHTON et al., 1983). Febre hemorrágica tem sido relatada em pacientes infectados com CHIKV na Tailândia (PIALOUX et al., 2007).

1.2. Vírus Chikungunya (CHIKV)

O vírus Chikungunya pertence ao gênero *Alphavirus*, Família *Togaviridae*. As partículas virais possuem envelope lipoprotéico contendo espículas de glicoproteínas virais, capsídeo de simetria icosaédrica e medem cerca de 60 a 70 nm de diâmetro (Figura 1). É sensível à ação de detergentes, solventes orgânicos e ao aquecimento superior a 58°C.

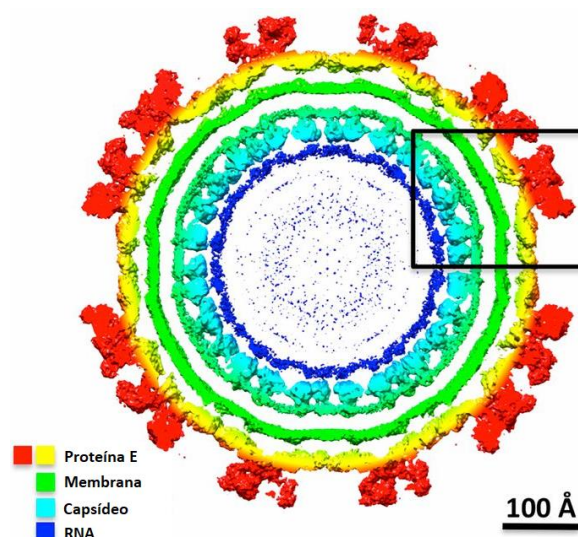


Figura 1. Estrutura da partícula do vírus Chikungunya (adaptado de Yap et al. 2017).

O genoma é constituído de RNA de fita simples de polaridade positiva (RNAs+) de aproximadamente 11,8 kb. A terminação 5' do RNA genômico é capeada e a

terminação 3' é poliadenilada; possui duas sequências de leitura aberta (ORF, *open reading frame*) contidos entre regiões não traduzidas (NTR) 5' e 3', de 76 nucleotídeos (nt). A ORF contida na terminação 5' é traduzida a partir do RNA genômico e codifica 1 poliproteína precursora de 4 proteínas não estruturais (NSP1-NSP4). A segunda ORF é traduzida a partir do RNA subgenômico 26S em 1 proteína precursora das proteínas estruturais: a proteína de capsídeo (C); 2 glicoproteínas de envelope (E1 e E2) e 2 pequenos peptídeos denominados E3 e 6k. A organização genômica segue a ordem 5'-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-C-E3-E2-6K-E1-poli(A)-3' (Figura 2).

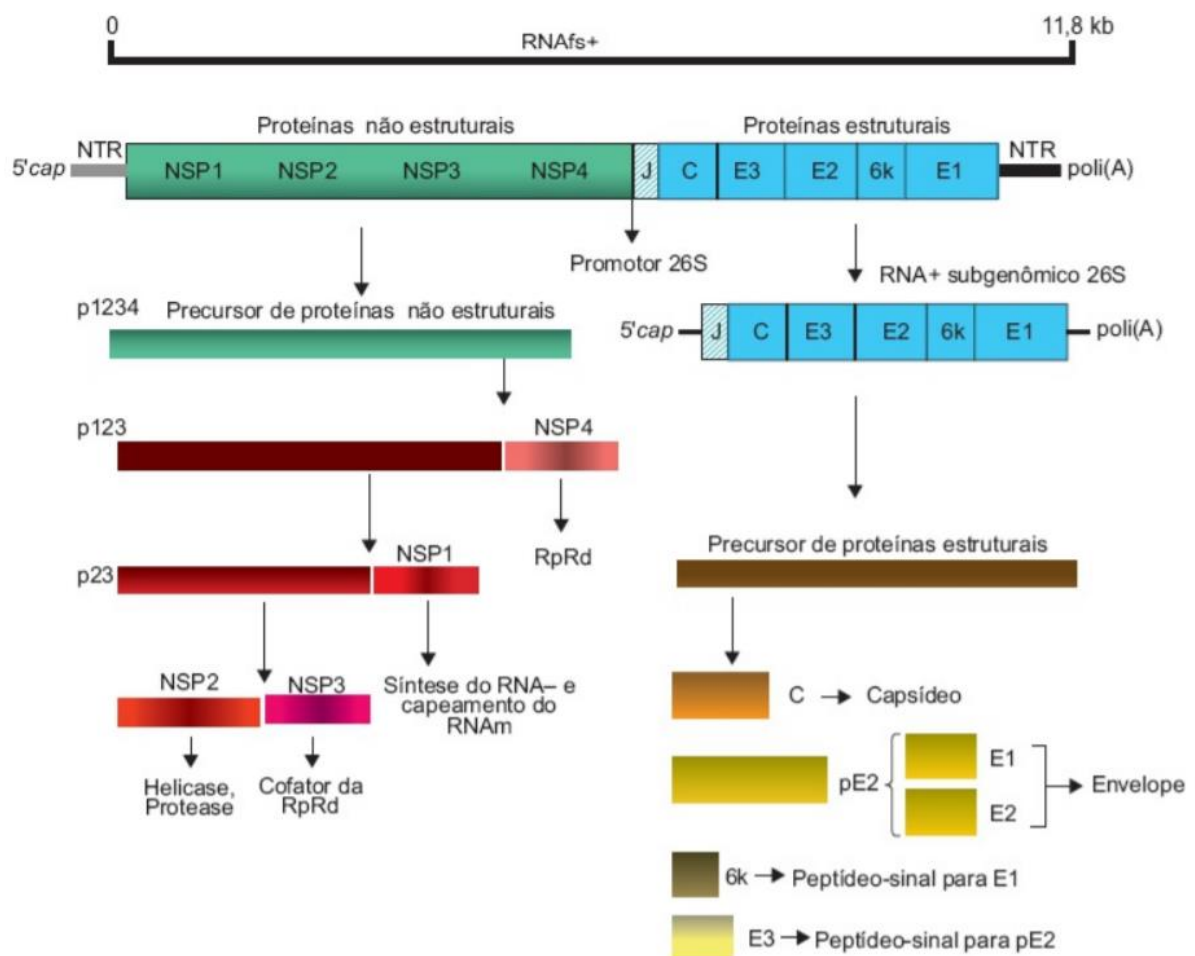


Figura 2. Organização genômica e produtos gênicos do vírus Chikungunya (adaptado de Santos et al. 2015).

A proteína NSP1 é associada à membrana que contém metiltransferase e guaniltransferase. Ela está envolvida no nivelamento do genoma (+) RNA (AHOLA & KAARIAINEN, 1995; MALET *et al.*, 2009). A proteína NSP2 é feita de três domínios, o primeiro contendo helicase, RNA triphosphatase e nucleosídeos trifosfatase

(WENGLER et al., 1993; DUBACH et al., 1994; MALET et al., 2009), enquanto que o segundo e terceiro domínios são papaína-protease e uma metiltransferase não funcional, respectivamente (STRAUSS et al., 1992). Além disso, NSP2 contém um sinal de localização nuclear que permite que 50% do NSP2 traduzido irá ser translocado para o núcleo (MALET et al., 2009).

A proteína NSP4 é de RNA polimerase dependente de RNA, sendo essa, envolvida na replicação do genoma e transcrição (RUBACH et al., 2009). As funções e atividades da proteína NSP3 são menos compreendidas. Embora esteja envolvida no processo de transcrição em uma fase precoce da infecção (WANG et al., 1994; MALET et al., 2009), nenhuma função ou atividade precisa têm sido atribuídas à esta proteína. A região do C terminal é menos conservada e é fosforilada em até 16 posições em serinas e treoninas (LI et al., 1990; LASTARZA et al., 1994; VIHIMEN et al., 2000). O papel da fosforilação não está bem documentado, mas a deleção dos resíduos fosforilados diminui o nível de síntese de RNA (VIHIMEN et al., 2001).

Segundo Santos *et al.*, (2015), os Alphavírus entram nas células alvo por endocitose. Em meio ácido, o endossoma desencadeia mudanças conformacionais no peptídeo do envelope viral que expõem a E1, e medeia a fusão da membrana do vírus na célula-hospedeira. Isto permite a libertação citoplasmática do núcleo e a libertação do genoma viral. Os dois precursores de proteínas não-estruturais (PTS), são convertidos a partir do RNAm viral, e a clivagem destes precursores gera NSP1 - NSP4.

Como descrito anteriormente, a NSP1 está envolvida na síntese da cadeia negativa do RNA viral. O NSP2 exibe atividades como a RNA helicase, RNA trifosfatase e proteinase, estando envolvido no desligamento da transcrição na célula hospedeira, NSP3 faz parte da replicase, já a NSP4 está relacionado ao RNA viral e a polimerase. Estas proteínas montam-se e formam o complexo de replicação viral, que sintetiza um RNA de cadeia negativa intermediário. Isto serve como molde para a síntese de ambos RNAs sub-genômicos (26S) e genômicos (49S). O RNA sub-genômico dirige a expressão do precursor de poliproteína C-pE2-6K-E1 que é processada por uma protease serina autoproteolítica. A cápside (C) é libertada, e as glicoproteínas pE2 e E1 são geradas por processamento adicional. As pE2 e E1 associadas ao Golgi são exportadas para a membrana plasmática, onde pE2 é clivada em E2 (que está envolvida na ligação ao receptor) e E3 (que medeia dobragem

adequada de pE2 e sua posterior associação com E1). A montagem viral é promovida pela ligação do nucleocapsídeo viral para o RNA viral e o recrutamento das glicoproteínas do envelope associado à membrana (Figura 3).

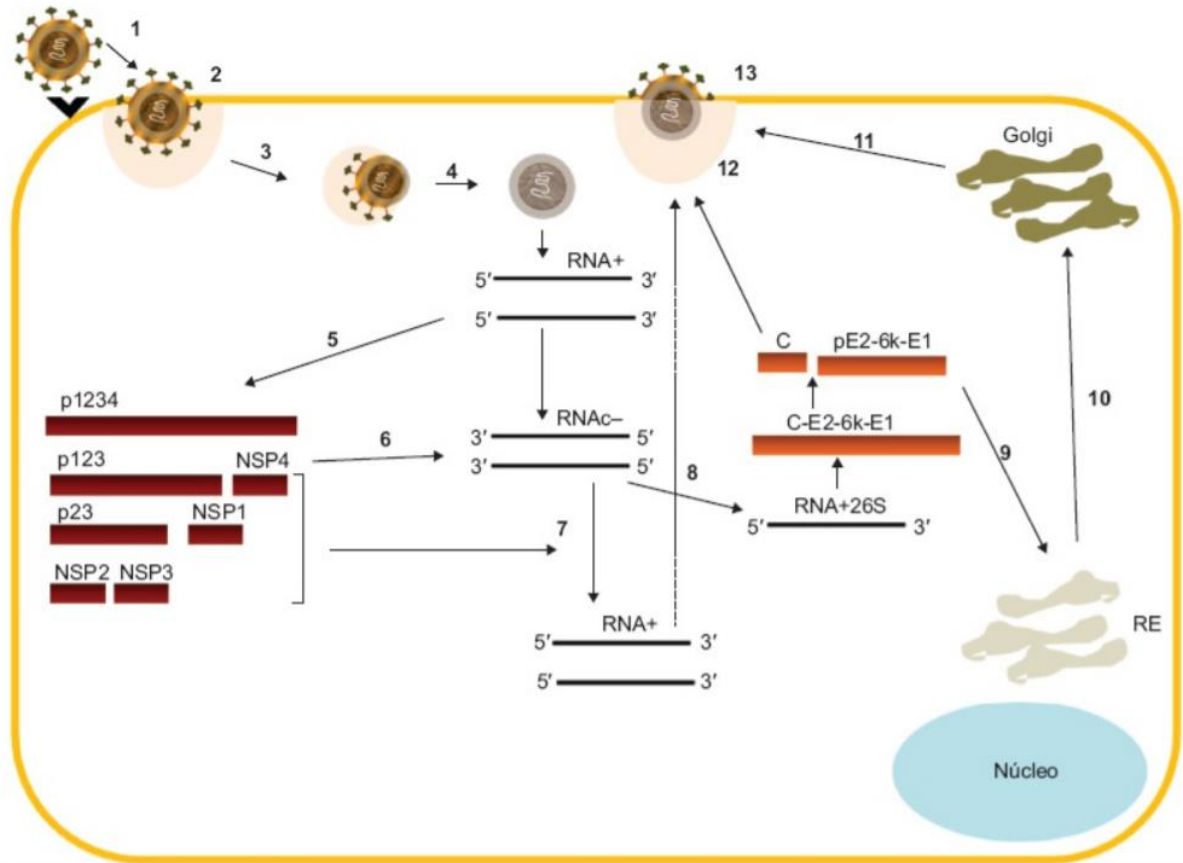


Figura 3. Biossíntese do vírus Chikungunya (adaptado de Santos et al. 2015).

CHIKV tem quatro principais linhagens (ou genótipos): Leste-Central-Sul Africano (ECSA), Oeste Africana, Asiática e do Oceano Índico (uma linhagem monofilética descendente recente da linhagem ECSA (Figura 4) (Volk et al., 2010; Dupont-Rouzeyrol et al., 2012).

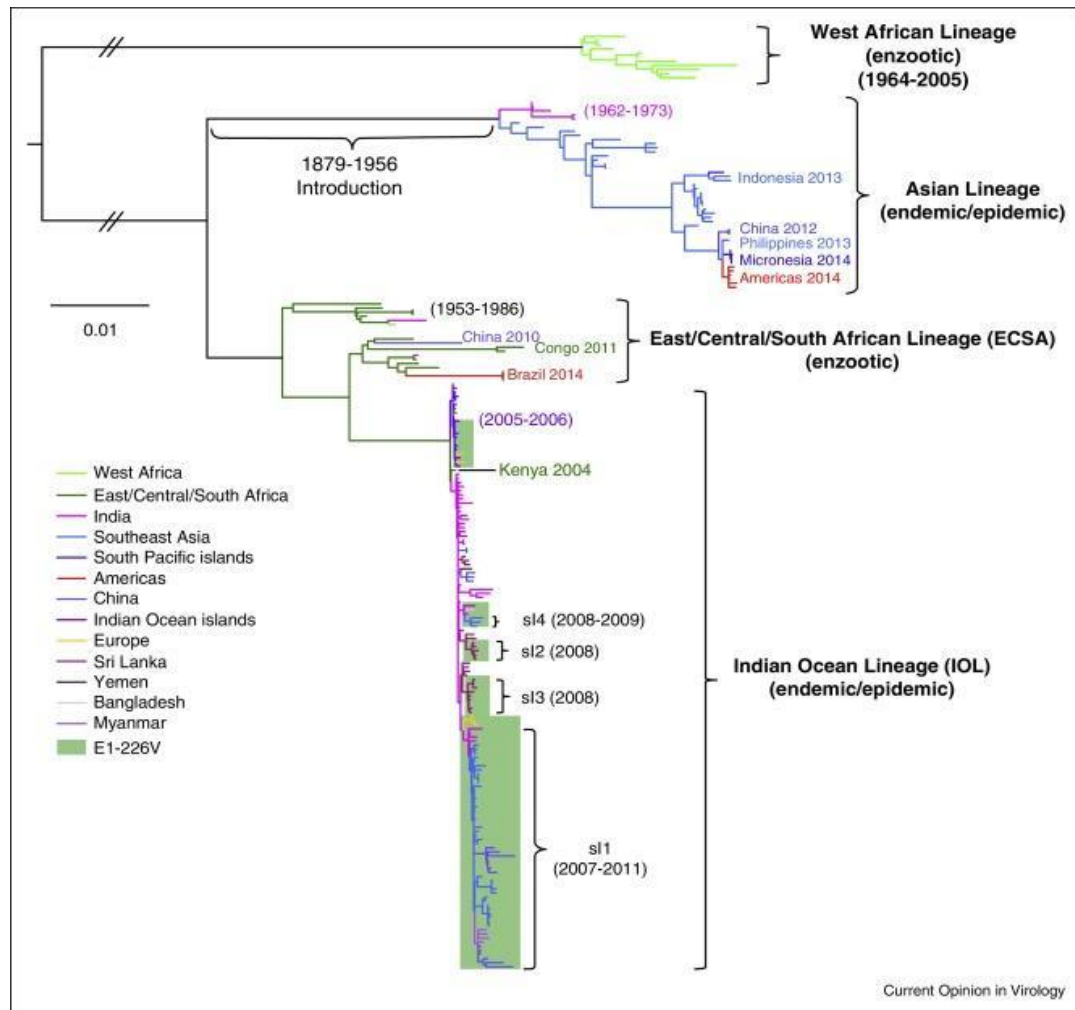


Figura 4. Análise filogenética do vírus Chikungunya, mostrando as quatro linhagens do vírus: Leste-Central-Sul Africano (ECSA), Oeste Africana, Asiática e Oceano Índico (adaptado de Tsetsarkin et al., 2016).

1.3. Aspectos Imunológicos da Febre Chikungunya

Em estudos com células vivas, o vírus Chikungunya parece replicar-se em fibroblastos, células progenitoras de músculo esquelético, e miofibras (Ozden et al, 2007). A resposta do interferon tipo-1 parece desempenhar um papel importante na resposta do hospedeiro à infecção Chikungunya. Após a infecção, fibroblastos do hospedeiro produzem o interferon-tipo1- α e interferon-tipo1- β (IFN- α e IFN- β). Em estudos com ratos expostos ao Chikungunya, com deficiências no INF-1 leva ao aumento da mortalidade (Schilte et al, 2010). Os componentes específicos do Chikungunya da via de interferon-tipo-1 envolvido na resposta do hospedeiro à infecção ainda são desconhecidos (White et al, 2011).

1.4. Vetores

Ching Ng & Hapuarachchi (2010) fizeram um levantamento epidemiológico vetorial interessante. Entre os anos de 1950 e 1970, epidemias na África e na Ásia ocorreram e ficou evidente o vínculo na transmissão da CHIKV por mosquitos vetores (GILOTRA & BHATTACHARYA, 1968; GILOTRA E SHAH, 1967; MCINTOSH ET AL., 1963; MYERS ET AL., 1965; PATERSON E MCINTOSH, 1964; SARKAR ET AL., 1967; SHAH ET AL, 1964; WEINBREN ET AL., 1958).

Na África, CHIKV foi tipicamente mantida num ciclo silvestre envolvendo primatas não-humanos, mosquitos que habitam a floresta e talvez roedores. Posteriormente, foi introduzido na área urbana, onde a transmissão de humano para humano é mantido pela picada de mosquitos peridomésticos (POWERS E LOGUE, 2007). Os vetores de CHIKV parecem ser diversificados na África.

Os ciclos silvestres são sustentados por *Aedes africanus* em Uganda e Bangui, *Aedes cordellieri* em África do Sul, *Aedes furcifer-taylori* na África do Sul e Senegal (DIALLO et al., 1999), e *Aedes luteocephalus* e *Aedes dalzieli* em Senegal (ANDERSON et al, 1965; CORNET E CHATEAU, 1974 DIALLO ET AL., 1999 JUPP E MCINTOSH, 1990; MCINTOSH ET AL., 1963; MOORE ET AL., 1974). A espécie *Aedes aegypti* não parece estar envolvida na transmissão silvestre de CHIKV, está diretamente envolvida na doméstica e têm desempenhado um papel importante em epidemias urbanas no Quênia (Chretien et al., 2007), Comores (SANG et al., 2008) e no Senegal (DIALLO ET AL., 1999).

Da mesma forma, *A aegypti* tinha sido o vetor principal na Ásia, onde CHIKV é em grande parte mantido em ciclos urbanos. Durante o ressurgimento das epidemias por CHIKV, o vetor clássico *Aedes aegypti*, manteve-se como o principal vetor na fase inicial de surtos no Quênia, Seychelles, Comores, Singapura e Índia (CHRETIEN et al., 2007; KAUR et al, 2008; KUMAR et al., 2008; LEO et al., 2009; NG et al., 2009 e SANG et al., 2008). No entanto, *A. albopictus* foi incriminado como o principal vetor de CHIKV nas Ilhas Reunion, Mayotte, Camarões, Gabão, Tailândia e Malásia (BAGNY et al., 2009 e DELATTE et al., 2008), bem como na Índia, Cingapura e Sri Lanka, durante a fase tardia de surtos (KUMAR et al, 2008; NG et al, 2009; NORIDAH et al., 2007; SAMUEL et al., 2009 e THAVARA et al., 2009). O CHIKV tem a mesma ecologia de transmissão no ciclo urbano do DENV e ZIKV. Ambas as espécies de *Aedes* que estão em questão na América Latina, são vetores urbanos

que vivem de maneira sinantrópica e são completamente adaptados às habitações humanas e dependem de água doce perto destas habitações. Embora a distribuição de *A. aegypti* seja cosmotropical e possa favorecer a difusão CHIKV em todas as regiões neotropicais, o *A. albopictus* pode desempenhar um papel em ambos os trópicos e países de clima temperado (HIGA et al., 2011 e BENTO et al., 2007).

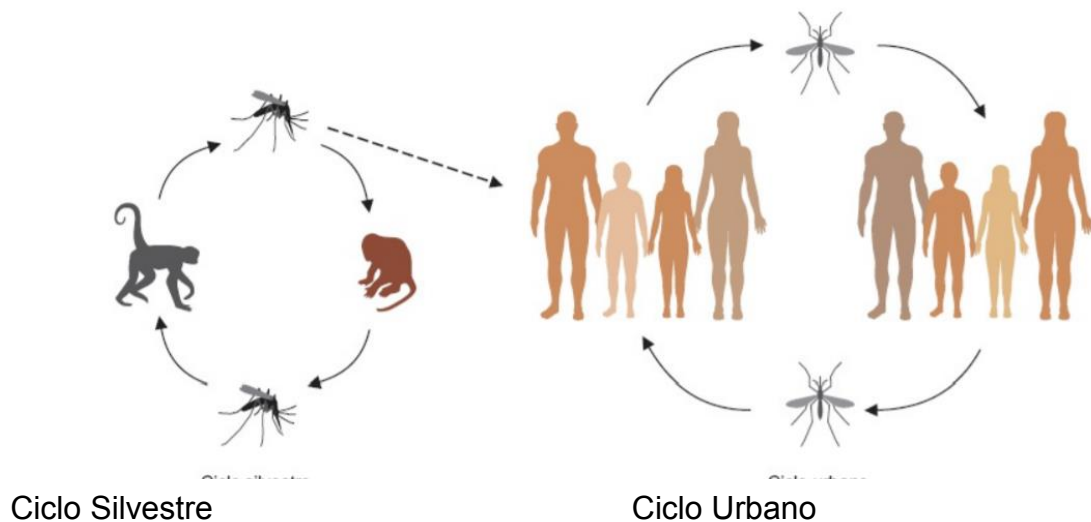


Figura 5. Ciclo epidemiológico do vírus Chikungunya na África. Adaptado de Santos et al. (2015).

De acordo com Ceretti-Junior *et al* (2014), culicídeos como *Wyeomyia* spp, foram encontrados na sua forma imatura em bromélias e outros reservatórios naturais da Mata Atlântica. À medida que a urbanização continua em ritmo acelerado, muitas cidades em todo o mundo se esforçam para preservar suas áreas verdes (KOH E SODHI 2004). A construção, preservação e reabilitação de áreas verdes em parques ou praças tem como objetivo proporcionar facilidades de lazer à população, reduzindo o estresse ambiental e social causado pela urbanização (MCINTYRE 2000, MCKINNEY 2008). Com o usufruto destas áreas, virá também a possibilidade de haver contato direto entre a população humana e de outros animais com os vetores silvestres que por hora ainda não estão sinantropizados.

1.5. Epidemiologia da Chikungunya no Brasil

No Brasil, os primeiros relatos descritos sobre a circulação do CHIKV surgiram no ano de 2014 com a notificação de 54 casos suspeitos distribuídos em 15 estados brasileiros, destes, 36 casos foram confirmados em 11 Estados diferentes, sendo todos eles importados de países com circulação do vírus. Houve 21 (58%) casos provenientes do Haiti, a maioria de militares e missionários; 10 (28%) casos da República Dominicana, 2 (5,5%) casos de Guadalupe, 2 (5,5%) casos da Venezuela e 1 (3%) caso oriundo da Guiana Francesa (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2014).

O primeiro caso de transmissão local ocorreu no município de Oiapoque, localizado no extremo norte do Estado do Amapá, em 13 de setembro de 2014, logo em seguida, apenas oito dias depois, houve um segundo relato na cidade de Feira de Santana, no Estado da Bahia (NUNES et al., 2015). Ainda em 2014 foram confirmados 2.772 casos de CHIKV, distribuídos em seis Unidades Federativas: Amapá 1.554 casos (55%), Bahia 1.214 (43%), Distrito Federal 2 (0,8%), Mato Grosso do Sul 1 (0,4%), Roraima 1 (0,4%) e Goiás 1 (0,4%) (HONÓRIO et al., 2015).

Em 2015, Semana Epidemiológica (SE 1) a Semana Epidemiológica (SE 52), foram registrados no país 38.499 casos prováveis de febre de Chikungunya (taxa de incidência de 18,8 casos/100 mil hab.), distribuídos em 704 municípios, dos quais 17.971 (46,7%) foram confirmados. Houve também confirmação de 14 óbitos por febre de Chikungunya, nas seguintes UFs: Bahia (5 óbitos), Sergipe (2 óbitos) e Pernambuco (7 óbitos). A mediana de idade dos óbitos foi de 73 anos. Nesse mesmo ano, até a semana epidemiológica 50, foram registrados 38.240 casos prováveis de febre de Chikungunya (Figura 6), com uma taxa de incidência de 18,7 casos/100 mil hab.

Em 2016, até a SE 50, foram registrados 265.554 casos prováveis de febre de Chikungunya no país, com uma taxa de incidência de 129,9 casos/100 mil hab. Esses casos prováveis estão distribuídos em 2.785 municípios; destes, 146.914 (55,3 %) foram confirmados. A análise da taxa de incidência de casos prováveis (número de casos/100 mil hab.), por regiões geográficas, demonstra que a região Nordeste apresentou a maior taxa de incidência: 407,7 casos/100 mil hab. Entre as UFs, destacam-se Rio Grande do Norte (714,0 casos/100 mil hab.), Ceará (520,9 casos/100 mil hab.), Alagoas (509,7 casos/100 mil hab.) e Pernambuco (510,6 casos/100 mil

hab.).

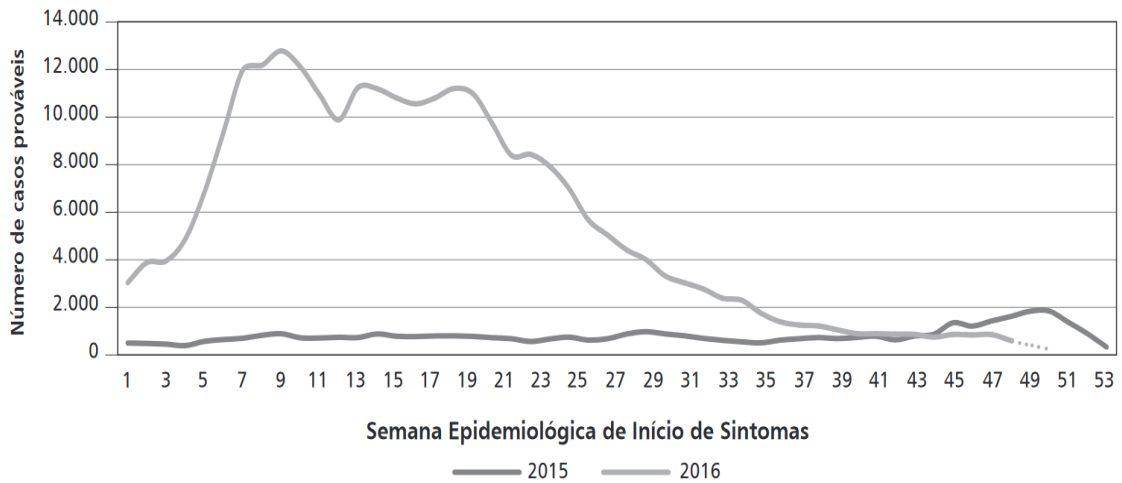


Figura 6. Casos prováveis de febre de Chikungunya, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2015 e 2016 (SVS, 2017).

Foram confirmados 159 óbitos por febre de Chikungunya, nas seguintes UFs, com a seguinte distribuição: Pernambuco (54), Paraíba (32), Rio Grande do Norte (25), Ceará (21), Rio de Janeiro (9), Alagoas (6), Bahia (4), Maranhão (5), Piauí (1), Sergipe (1) e Distrito Federal (1), respectivamente. A mediana de idade dos óbitos foi de 62 anos, variando de 0 a 98 anos. Observou-se que a maior parte dos óbitos por Chikungunya, confirmados até a SE 49, ocorreu nos meses de fevereiro e março, com 28 e 42 óbitos, respectivamente. Na Figura 7 é possível observar a distribuição da incidência de casos prováveis de febre de Chikungunya, até a SE 50, segundo município de residência.

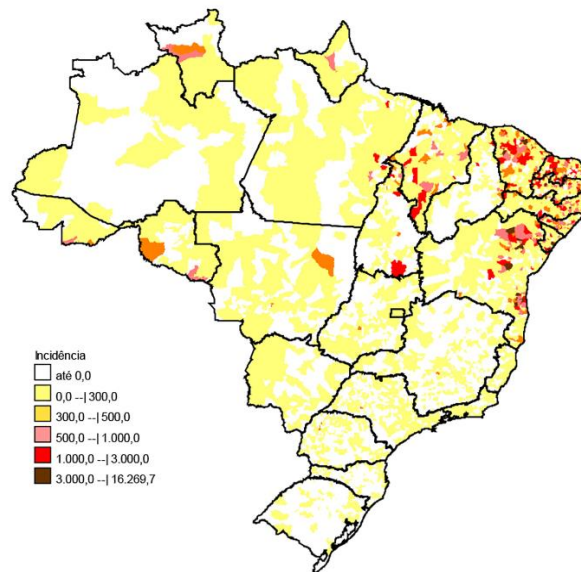


Figura 7. Incidência (/100 mil hab.) de febre de Chikungunya por município de residência, até a Semana Epidemiológica 50, Brasil, 2016 (SVS, 2017).

Observou-se que há ocorrência de casos em todo o país, e maior incidência nos estados da região Nordeste. Diante deste cenário, torna-se importante o fortalecimento da vigilância epidemiológica de arbovírus no Brasil, a exemplo do que foi desenvolvido neste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver um modelo de vigilância de arbovírus em humanos e vetores no Município de Natal-RN.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Pesquisar o Chikungunya em vetores e humanos no Município de Natal-RN;
- b) Descrever o perfil epidemiológico da Chikungunya no Município de Natal-RN;
- c) Identificar os possíveis vetores envolvidos na transmissão de Chikungunya no Município de Natal-RN.

3. METODOLOGIA

3.1. Amostras Estudadas

3.1.1. Área de estudo

A área de abrangência do presente estudo corresponde aos cinco distritos sanitários que contemplam toda Natal, onde segundo o IBGE, (2014) tem uma população estimada em 877.000 habitantes. Distrito Sanitário Norte I (DSNorte I), Distrito Sanitário Norte II (DSNorte II), Distrito Sanitário Leste (DSLeste), Distrito Sanitário Oeste (DSOeste) e Distrito Sanitário Sul (DSSul). As delimitações distritais dos bairros, ficam bem elucidadas ao se observar a figura 8.

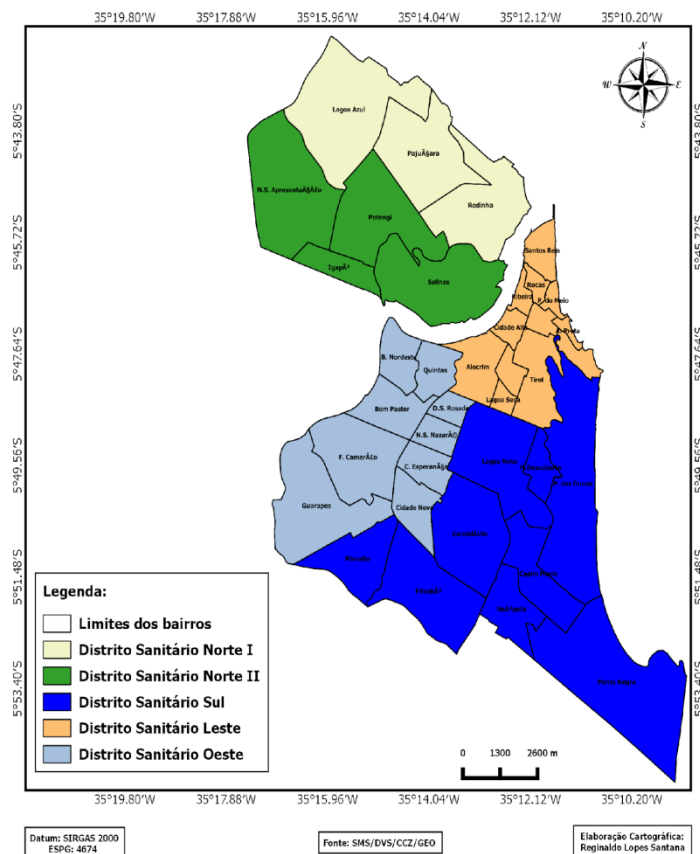


Figura 8. Divisão de bairros e Distritos Sanitários de Natal-RN. (SMS/DVS/CCZ/GEO, 2017).

3.1.2. Coleta de amostras humanas e aspectos éticos

Foram estudados casos humanos com sinais e sintomas compatíveis com infecção por arbovírus. Para isso, houve a elaboração de uma ficha de investigação de campo pela equipe responsável pelas ações do estudo, que se adequa às demais arboviroses, além da CHIKV, toda amostra era vinculada à ficha devidamente numerada (anexo A). O estudo foi desenvolvido no período de fevereiro a julho de 2016, através de busca ativa feita pela equipe de vigilância epidemiológica do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Natal. Todas as 104 amostras de sangue foram entregues no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical do RN e no Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Infecciosas e do Câncer da UFRN. Todas as amostras foram acompanhadas de ficha de identificação e dados de coleta em relação ao início da doença e características dos sintomas. As amostras de sangue foram mantidas à -70°C até o momento da utilização. Este projeto foi previamente submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CAAE: 51057015.5.0000.5537).

3.1.3. Coleta de amostras entomológicas

3.1.3.1 Armadilha de ovoposição - Armadilhas para coleta de ovos para estimativa de densidade vetorial

A ovitrampa é uma armadilha utilizada para ovipostura, são depósitos de plástico, na cor preta, com capacidade de 500 ml, contendo uma palheta de eucatex para coletar as posições das fêmeas. Sua inspeção foi semanal, para o recolhimento das palhetas e encaminhadas para o laboratório para leitura. Para a padronização da instalação das ovitrampas, foi seguido o modelo proposto por Albano *et al.* (2016). A instalação das armadilhas foi realizada a partir de uma distância entre elas pré-determinada com o auxílio do software Arcgis 9.3, responsável também pela escolha dos domicílios para as instalações que foi totalmente ao acaso e posteriormente georreferenciados, obedecendo um raio de ação de 300m entre as armadilhas (FIGURA 9). Os ovos coletados foram usados apenas para estimativa de densidade vetorial, não foram usados para pesquisa de arbovírus. Em cada armadilha estava

registrada, na face externa do depósito, a sigla de identificação do órgão responsável pela instalação, seguida do número de controle. A partir dessas informações, pode-se remeter à ficha de identificação que continham dados detalhados da armadilha. A ficha de visita era anexa à armadilha no ato do envio ao laboratório. Toda armadilha era escovada antes de ser reutilizada.

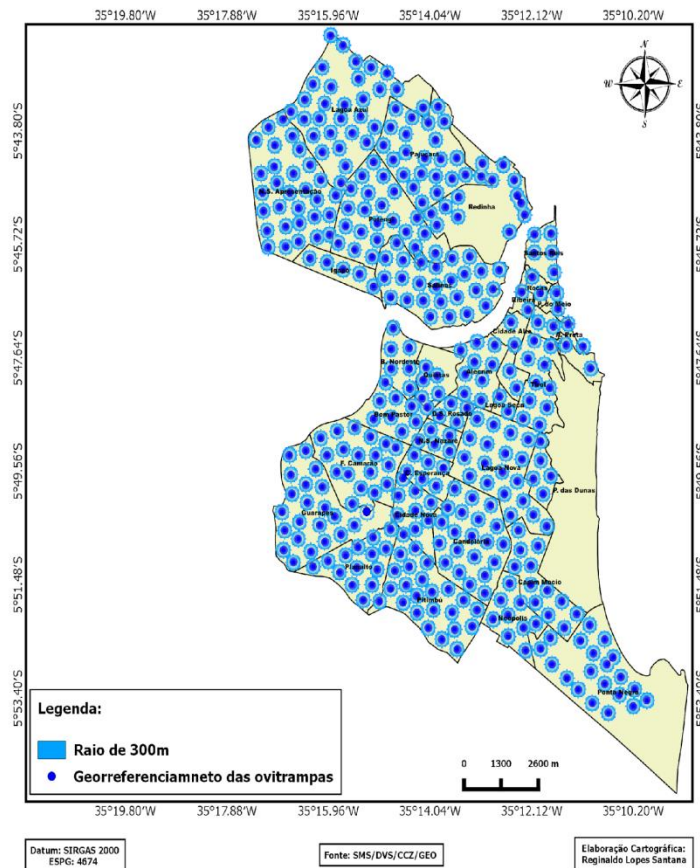


Figura 9. Geodisposição e dimensionamento de Ovitrapas no município de Natal-RN. (SMS/DVS/CCZ/GEO, 2017).

3.1.3.2 Coleta e preparo de mosquitos adultos

Os mosquitos foram coletados mensalmente durante um período de seis meses (fevereiro a julho de 2016). Todos os cinco distritos sanitários de Natal-RN foram contemplados, nos quais foram capturados vetores por busca ativa usando capturador de Castro e Puçá. Os mosquitos foram armazenados em potes plásticos com identificação e posteriormente encaminhados para a identificação em laboratório.

Dados como georeferenciamento, velocidade do vento, umidade relativa do ar, temperatura ambiente e status pluviométrico foram aferidos no local de coleta e anotados em ficha personalizada.

Em laboratório, os mosquitos foram anestesiados a -20°C por 1 minuto e depois colocados em placas de Petri sobre superfície congelada e posteriormente identificados com o auxílio de esteromicroscópio e chaves específicas (Consoli & Oliveira 1994; Forattini 2002). Os mosquitos foram agrupados de acordo com a espécie, sexo, local e data da coleta.

“Pools” de ≤ 30 mosquitos fêmeas foram macerados usando pistilos plástico em 500 μL de meio de Leibowitz L15 (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA), contendo 2% de soro fetal bovino, seguido de centrifugação a $2500 \times g$ durante 20 min a 4°C , para sedimentar as carcaças. O sobrenadante foi dividido em duas alíquotas e armazenado a -70°C até a sua utilização.

Foi calculada a taxa mínima de infecção (MIR), onde o valor é calculado dividindo-se o número de pools infectados por espécie pelo número total de mosquitos testados para cada espécie, multiplicado por 1.000 (CHOW et al., 1998).

3.2. Extração de RNA viral

O RNA viral foi extraído utilizando o kit QIAamp Viral RNA e seguindo toda recomendação do fabricante. Para tanto, as amostras foram tratadas pela solução de lise AVL e após lise, foram aplicadas a uma coluna com afinidade para RNA e submetidas a uma centrifugação de 8000 rpm por 1 minuto. Após a centrifugação, as amostras foram lavadas duas vezes, uma com a solução tampão AW1 e outra com a solução tampão AW2. Terminada a lavagem, o RNA foi eluído da coluna pela adição de 60 μL da solução tampão AVE e o resultante foi estocado a -70°C .

3.3. Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) para pesquisa do vírus Chikungunya

Para a pesquisa do vírus Chikungunya, foi utilizado o protocolo de qRT-PCR

descrito por Lanciotti et al. (2007).

3.4. Análise Espacial

Utilizou-se a técnica de Kernel para avaliar a distribuição espacial dos eventos, considerando também a distribuição da população, obtendo-se uma estimativa de taxa de incidência. A análise mais simplificada consiste na comparação visual de mapas suavizados para cada um dos processos (Santos *et al.*, 2001).

O estimador Kernel avalia os eventos tendo o ponto como unidade de análise. Considerando que o dado populacional é agrupado e a unidade mínima oficial de agrupamento é o setor censitário, ao atribuir-se ao centróide dessa região o dado populacional conhecido, tem-se a possibilidade de estimar a intensidade desse processo (população) usando-se uma função Kernel. Com essa abordagem, Kelsall e Diggle (1995) consideram o problema da estimativa da variação espacial do risco relativo equivalente à estimativa da razão de duas densidades bivariadas, com essa preocupação, foi feito Kernel sobre Kernel, deixando as populações estudadas isoladas. Ao se promover a razão entre as duas funções, foi obtida a intensidade do risco (Carvalho e Câmara, 2002) e o mapa produzido a partir dessa razão será um mapa de risco relativo (Sabel *et al.*, 2000).

Os casos estudados foram georreferenciados no Google Earth e Maps, sendo posteriormente identificadas as coordenadas (x, y) em graus decimais e adicionados ao software Quantum Geographic Information System 2.12.3-Lyon – (QGIS). Um sistema de informação geográfica (SIG) gratuito e licenciado sob a *General Public License* (GNU, Version 2, June 1991).

Usou-se para densidade de ovos a ferramenta de interpolação com peso pelo intervalo da distância (IDW) e banda simples falsa-cor linear, modo de intervalo igual com três classes de corte de contagem cumulativa de dois por cento (2%). Já para o Kernel dos dados de humanos e vetores infectados com CHIKV, usou-se raio 300 metros na forma Quártica (Biponderal) com banda simples falsa-cor linear, com os parâmetros restantes iguais aos supracitados na densidade de ovos.

3.5. Modelo tradicional de intervenção para controle de vetores a ser comparado com o atualmente executado.

Segundo Guia de Vigilância Epidemiológica (2010), não existem medidas de controle específicas direcionadas ao homem, uma vez que não se dispõe de nenhuma vacina ou drogas antivirais. A notificação dos casos suspeitos, a investigação do local provável de infecção, bem como a busca ativa de casos são elementos fundamentais. Atualmente, o único elo vulnerável da cadeia epidemiológica é o mosquito. Assim, o controle está centrado na redução da densidade vetorial.

A única garantia para que não exista dengue ou outro arbovírus é a ausência de circulação viral e a manutenção de níveis baixos de infestação do vetor. Embora não exista determinação precisa do limite abaixo do qual se possa ter certeza de que não ocorrerão surtos de arbovírus, há evidências que esse nível deve ser abaixo de 1%. Dessa forma, em áreas com *Aedes*, o monitoramento do vetor deve ser realizado rotineiramente para conhecer as áreas infestadas e desencadear as medidas de controle em manejo ambiental como (i) mudanças no meio ambiente que impeçam ou minimizem a propagação do vetor, evitando ou destruindo os criadouros potenciais do *Aedes*, (ii) melhoria de saneamento básico e coleta de resíduos sólidos, (iii) participação comunitária, no sentido de evitar a infestação domiciliar do *Aedes*, mantendo o ambiente domiciliar livre de potenciais criadouros do vetor, e (iv) do controle químico. São as seguintes modalidades de intervenção: tratamento focal (larvário); perifocal em Pontos Estratégicos – PE (cemitérios, ferros-velho, portos, pontos de reciclagem, parques, terrenos baldios, etc.); espacial (Ultra Baixo Volume, restritos aos bloqueios de casos em períodos não epidêmicos e para controle de epidemias).

Mapeamento rápido dos índices de infestação por *Aedes aegypti* (LIRAA). É a principal ferramenta utilizada no Brasil, para norteamento das ações de controle de *Aedes*, onde os critérios de adesão dos municípios são: capitais e municípios de regiões metropolitanas; municípios com mais de 100 mil habitantes e municípios com grande fluxo de turistas e de fronteira. Desencadeamento da ação: o município é dividido em grupos de 9 mil a 12 mil imóveis com características semelhantes. Em cada grupo, também chamado estrato, são pesquisados 450 imóveis. Os estratos com índices de infestação predial inferiores a 1%, estão em condições satisfatórias, de 1%

a 3,9%, estão em situação de alerta e superior a 4%, há risco de surto. Vale salientar que ainda hoje essas ferramentas estão focadas em *Aedes* como vetor única e exclusivamente envolvido na transmissão de Dengue (MANUAL BRASIL CONTRA DENGUE, 2008).

As estratificações dos municípios são categorizadas em dois estratos, em função da presença ou não do vetor *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus*.

- Estrato I – municípios infestados, aqueles com disseminação e manutenção do vetor nos domicílios.
- Estrato II - municípios não infestados, aqueles em que não foi detectada a presença disseminada do vetor nos domicílios ou, nos municípios anteriormente infestados, que permanecerem 12 meses consecutivos sem a presença do vetor, de acordo com os resultados do levantamento de índice bimestral ou do monitoramento por intermédio de armadilha, conforme normas técnicas.

Há uma preconização do Ministério da Saúde que as intervenções de controle larval, contemplem pesquisa larvária amostral, bimestral ou quatro levantamentos rápidos de índices entomológicos (LIRA) ao ano. Além de visita domiciliar bimestral em 100% dos imóveis. Pesquisa larvária nos pontos estratégicos, em ciclos quinzenais, com tratamento focal e/ou residual, com periodicidade mensal para o tratamento residual. As condições preconizadas como ideais, são a disponibilidade de um agente para cada 800 a 1.000 imóveis, assim como, um rendimento diário de 20 a 25 imóveis/dia. Tendo como ressalva o rendimento médio de 20 a 25 imóveis por dia somente é alcançado com carga horária de oito horas diárias. Além de serem efetuadas em seis ciclos bimensais por ano, todo o município precisa ser contemplado por igual, havendo possível priorização em bairros com ocorrência de óbitos de humanos por Dengue e/ou LIRA muito elevado.

3.5.1. Metodologias de levantamento de índices larvários

A amostragem de imóveis e criadouros com água positiva para larvas de *Aedes aegypti* é um componente fundamental para a atividade de vigilância entomológica. A pesquisa larvária tem diferentes objetivos, como a estratificação das áreas de risco entomológico, monitoramento das atividades de controle e avaliação das metodologias de controle.

Geralmente, o número de casas a se inspecionar deve ser baseado no nível desejado de precisão dos resultados e no número total de casas da localidade. Vários métodos podem ser utilizados para eliminar ou reduzir ao mínimo possível o erro e que podem ser aplicados para a seleção das casas onde serão feitas pesquisas larvárias.

- Amostra sistemática – selecionam-se casas na localidade, com base em um percentual a ser visitado, de acordo com o número de imóveis envolvidos. Esse é o caso do levantamento de índice amostral (LI), que vem sendo empregado no país desde a década de 1980.

- Amostra por conglomerados – em uma cidade ou zona geográfica de grande porte, muitas vezes é difícil utilizar o método de amostra sistemática, devido às limitações de tempo, de recursos financeiros e operacionais. Nesse caso, a seleção pode ser realizada em duas etapas. A primeira etapa é obtida por meio da amostra aleatória simples ou estratificada de grupos ou conglomerados da localidade (quarteirões, por exemplo). Uma vez identificados esses conglomerados, aplicam-se procedimentos de amostragem para identificar as casas específicas a serem visitadas dentro de cada quarteirão. Esse é o caso da metodologia do Levantamento de Índice Rápido para *Aedes aegypti* (LIRAA).

O LIRAA foi desenvolvido em 2002, para atender à necessidade dos gestores e profissionais que operacionalizam o programa de controle de dengue de dispor de informações entomológicas em um ponto no tempo (antes do início do verão) antecedendo o período de maior transmissão, com vistas ao fortalecimento das ações de combate vetorial nas áreas de maior risco. Trata-se, fundamentalmente, de um método de amostragem que tem como objetivo principal a obtenção de indicadores entomológicos, de maneira rápida.

Os indicadores entomológicos passíveis de serem construídos por meio dos dados obtidos nesses levantamentos são aqueles que são utilizados na rotina dos programas de combate vetorial, quais sejam: índices de Infestação Predial (IIP), Breteau (IB) e de Tipo de Recipiente (ITR).

As técnicas de amostragem/parâmetros amostrais/procedimentos são critérios para delimitação da amostra do LIRAA em cada município e são determinadas em função de sua densidade populacional, do número de imóveis e de quarteirões existentes, considerando sempre como unidade primária de amostragem o quarteirão. Em municípios de médio e grande porte, a amostragem é de conglomerados em dois estágios: quarteirões (unidade primária) e imóveis (unidade secundária). Essa forma de amostragem permite menor concentração de imóveis nos quarteirões sorteados, propiciando a divisão dos municípios de médio e grande porte em estratos de no mínimo 8.100 imóveis e de no máximo de 12.000 imóveis, sendo o ideal 9.000 imóveis. Em cada estrato, sorteia-se uma amostra independente de no máximo 450 imóveis, número que poderá variar de acordo com o número de imóveis do estrato. O número de quarteirões que compõem a amostra é obtido pela divisão do número de imóveis da amostra (máximo de 450) dividido por um quinto do tamanho médio do quarteirão. O tamanho médio do quarteirão é obtido pela divisão do número de imóveis do estrato pelo número de quarteirões do mesmo estrato.

A inspeção de cada quarteirão sorteado deve ser iniciada pelo primeiro imóvel, com deslocamento no sentido horário, contando-se quatro imóveis após o primeiro para, a seguir, inspecionar o sexto imóvel (segundo da amostra) e assim sucessivamente, inspecionando-se um imóvel a cada cinco, o que corresponde a 20% dos imóveis existentes no quarteirão sorteado. Tal estratificação possibilita uma melhor representatividade do Índice de Breteau (IB), pois esse indicador relaciona-se a uma área geográfica menor quando comparado ao método tradicional, que utiliza o município como base geográfica. Essa estratégia permite priorizar e selecionar ações de controle para áreas de maior risco dentro do município.

Em municípios pequenos, com número de edificações inferior a 8.100 imóveis, utiliza-se uma amostra por conglomerado em estágio único, mediante sorteio de quarteirões, cujo tamanho é obtido pela divisão do número dos imóveis da amostra pela média do número de imóveis dos quarteirões, sendo pesquisados 100% desses. A verificação da precisão do plano de amostragem foi baseada no estudo dos

intervalos de confiança estimados para o IB, considerando-se sua amplitude e eficácia. A medida utilizada no estudo da amplitude dos intervalos de confiança foi o coeficiente de variação do IB, para o qual se adotou 30% como limite tolerável para que as estimativas fossem consideradas confiáveis. Para esses valores, foram aceitos erros relativos de amostragem, desde que indicassem com segurança que o limiar de risco (IB=5) não fosse atingido.

A operacionalização do LIRAA exige um minucioso levantamento de informações. Dentre os procedimentos necessários, destaca-se a elaboração prévia do reconhecimento geográfico da área a ser trabalhada (qualquer aglomerado de imóveis), que propicia registros atualizados do número de quarteirões e imóveis existentes, com possibilidade de elaboração de mapas e, conseqüentemente, melhor visualização dos estratos. Outra informação fundamental diz respeito aos tipos e definição de recipientes com potencial de se tornarem criadouros do *Aedes aegypti*, que foram classificados em cinco grupos:

Grupo A – depósitos para armazenamento de água;

Grupo B – depósitos moveis;

Grupo C – depósitos fixos;

Grupo D – depósitos passíveis de remoção;

Grupo E – depósitos naturais.

A inspeção dos imóveis da área urbana do município é realizada nas casas e nos terrenos baldios. Nos prédios verticais, deve ser inspecionado somente o térreo de toda área comum do edifício. Os pontos estratégicos (cemitérios, borracharias, depósitos de sucata, depósitos de materiais de construção etc.) não são incluídos na amostra.

3.6. Modelo inovador de vigilância epidemiológica para intervenção e bloqueio de arboviroses em Natal-RN

A escolha da metodologia de intervenção para o controle vetorial é baseada no nível de risco em que a área é classificada. As respostas foram classificadas em resposta inicial, respostas oportunas e respostas tardias. Essas nomenclaturas se

referem à característica epidemiológica que a doença assume no momento: a resposta inicial são as ações voltadas para áreas onde a doença tem comportamento endêmico e não há (re)introdução de sorotipos virais; a resposta oportuna, para áreas que apresentem indicadores que apontem para a formação de uma epidemia ou para a ocorrência de um surto; e a resposta tardia, são as ações que servem para controlar as epidemias em curso (BARBOSA *et al.* 2017).

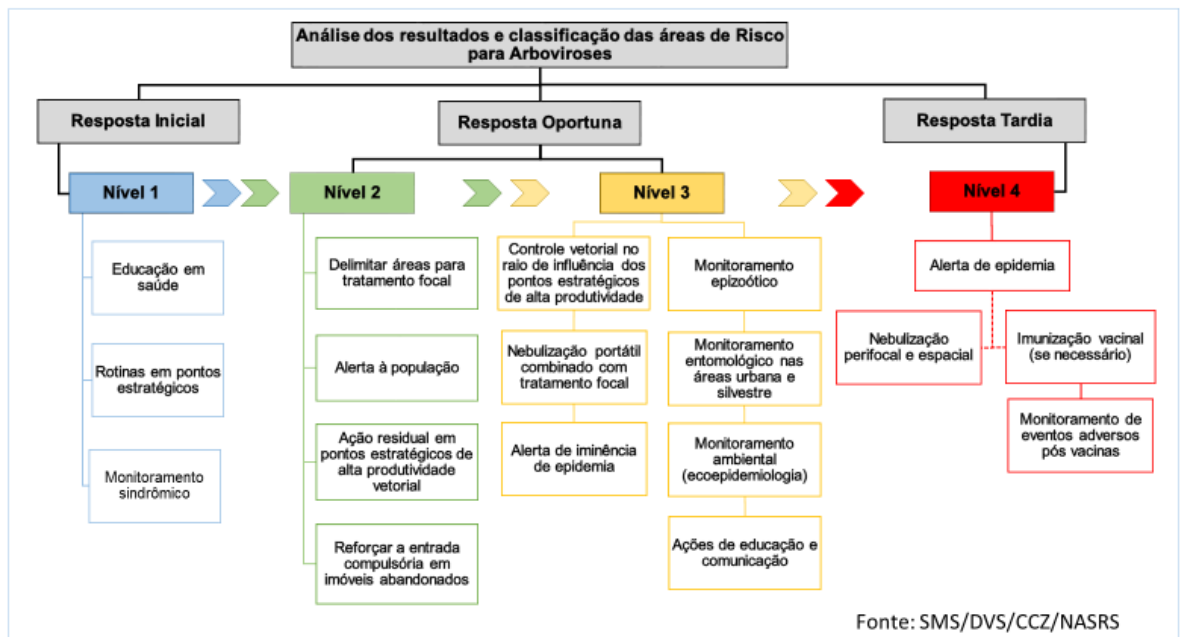
Seguindo o relato de intervenção proposto por Barbosa *et al.*, (2017), este trabalho baseou-se em quatro fundamentos: (1) obtenção semanal dos indicadores epidemiológicos e entomológicos, esse fundamento foi detalhado por completo ao se descrever busca ativa de casos humanos, utilização de Ovitampas para obtenção de índice de densidade de ovos de *Aedes sp.*, busca ativa de vetores em pontos estratégicos no município de Natal-RN; (2) criação de categorias de risco baseado nos indicadores epidemiológicos e entomológicos, todas as ações são cumulativas ao nível subsequente (Figura 10); (3) classificação semanal dos bairros da cidade de Natal em áreas com distintos níveis de risco, a fim de identificar as áreas de maior probabilidade para a ocorrência de surtos e epidemias, as áreas foram categorizadas de acordo a análise dos dados obtidos (Figura 11) ; (4) estabelecimento de estágios de resposta para cada nível de risco, considerando as intervenções mais adequadas para cada nível.

O tratamento focal, desencadeado por agentes de endemia do município de Natal-RN, houve a utilização do Éter piridiloxipropílico (piriproxifeno) no controle larval. As ações com UBV portátil nos surtos identificados foi usado o organofosforado (malationa) para controle dos culicídeos alados, além do piretroide (lambda-cialotrina).



Fonte: SMS/DVS/CCZ/NASRS

Figura 10. Categorias de risco baseado nos indicadores epidemiológicos e entomológicos. Adaptado de: Barbosa *et al.* (2017).



Fonte: SMS/DVS/CCZ/NASRS

Figura 11. Classificação de áreas de risco para Arboviroses. Adaptado de: Barbosa *et al.* (2017).

3.7. Análise Estatística

Para análise estatística, foi utilizado o programa STATA com número de licença 30110576660. A análise de entre espécies de vetores coletadas, quantidade de indivíduos por Pool e positividade vetorial para CHIKV, foi obtida, utilizando teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), além da comparação da distribuição do número de mosquitos por “*pool*” entre as espécies.

4. RESULTADOS

4.1. Busca ativa de pacientes humanos com sintomatologia sugestiva de Arbovírus no município de Natal-RN

Entre fevereiro e julho de 2016, foram coletados pela Equipe de Vigilância Epidemiológica do Centro de Controle de Zoonoses de Natal-RN, 104 amostras de sangue de humanos para serem submetidas ao teste de RT-PCR em tempo real para CHIKV. O perfil de amplificação do vírus Chikungunya pode ser visualizado na figura 12. Um total de 57 (54,8%) casos foram positivos para Chikungunya. Das amostras positivas para CHIKV, 34 (59,6%) foram mulheres e 23 (40,35%) foram homens (Tabela 1). Não houve diferença significativa nos casos positivos ao se comparar o gênero.

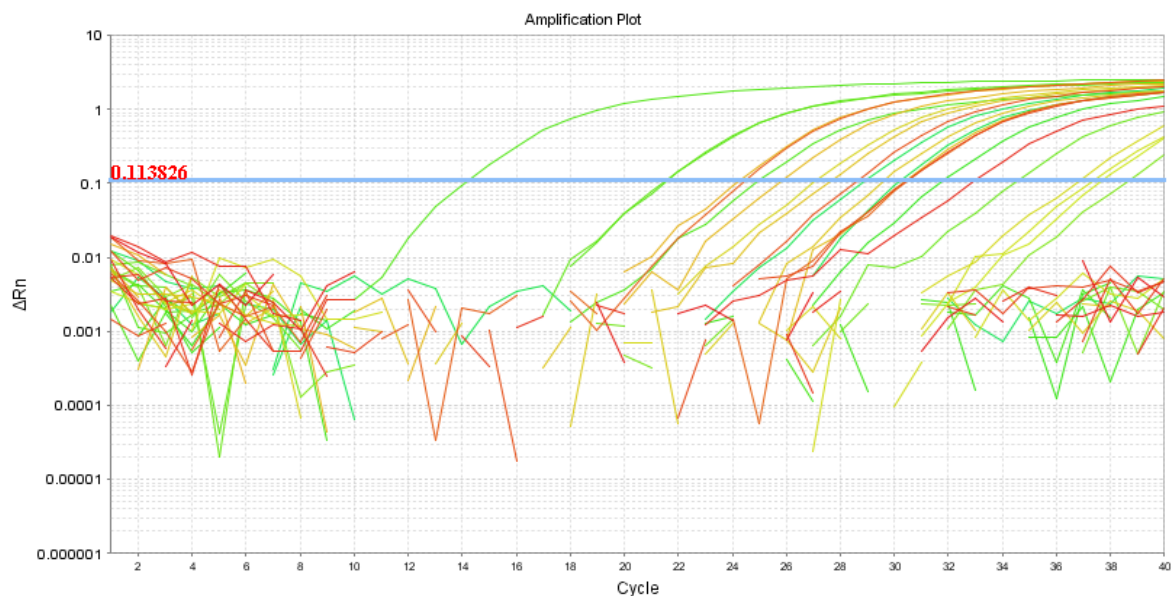


Figura 12. Perfil de amplificação dos vírus Chikungunya neste estudo através da técnica de RT-PCR em tempo real (Sistema TaqMan).

Tabela 1. Distribuição dos casos investigados para Chikungunya de acordo com o gênero.

Gênero			
CHIKV	Homens	Mulheres	Total
+	23	34	57
-	13	34	47
Total	36	68	104
x= 1,3153 p= 0,2514			

4.2. Distribuição das espécies de vetores no Município de Natal-RN.

Das amostras de mosquitos coletadas, apenas as fêmeas foram submetidas a pesquisa de arbovírus. Foram coletadas e estudadas 816 fêmeas, sendo 421 (51,59%) *Aedes aegypti*, 312 *Aedes albopictus* (38,23%), 56 (6,86%) *Wyeomyia spp*, 23 (2,81%) *Culex quinquefasciatus*, 3 (0,36%) *Ochlerotatus scapularis* e 1 (0,12%) *Haemagogus leucocelaenus*.

4.3 Pesquisa do Vírus Chikungunya no Município de Natal-RN.

O vírus Chikungunya foi investigado nos 816 culicídeos fêmeas, agrupados por espécie em 114 pools no total, sendo 62 pools de *Aedes aegypti*, 44 pools de *Aedes albopictus*, 5 pools de *Wyeomyia spp.*, 1 pool de *Culex quinquefasciatus*, 1 pool de *Ochlerotatus scapularis* e 1 pool de *Haemagogus leucocelaenus*.

Tabela 2. Relação entre as espécies de culicídeos e a Taxa de Infecção Mínima (MIR).

Espécie	Mediana				MIR
	de mosquitos /Pool	Indivíduos coletados (fêmeas)	Número de pools	Número de pools positivos	
<i>Aedes aegypti</i>		421 ^a	62 ^{ns}	5 ^{ns}	11,87
<i>Aedes albopictus</i>		312 ^a	44 ^{ns}	2 ^{ns}	6,41
<i>Wyeomyia spp.</i>		56 ^b	5 ^{ns}	1 ^{ns}	17,85
<i>Culex quinquefasciatus</i>		23 ^c	1	0	0
<i>Ochlerotatus scapularis</i>		3 ^d	1	0	0
<i>Haemagogus leucocelaenus</i>		1 ^d	1	0	0

Um total de 5 pools de *Aedes aegypti* foram positivos para Chikungunya, representando uma Taxa de Infecção Mínima (MIR) igual a 11,87. Na mesma análise, um total de 2 pools de *Aedes albopictus* foram positivos para Chikungunya (MIR = 6,41). Foi possível detectar o vírus Chikungunya em 1 pool de *Wyeomyia spp.* (MIR = 17,85), revelando a maior taxa de infecção mínima dentre os vetores pesquisados, uma vez que um pool dentre apenas cinco positivados, apresentou-se positivo para o vírus. Não foram identificados nos pools positivos para as espécies *Ochlerotatus scapularis* e *Haemagogus leucocelaenus*.

4.4 Densidade de ovos de *Aedes sp.* no Município de Natal-RN.

Ao se observar a evolução da densidade de ovos de *Aedes sp.* no município de Natal-RN, nota-se pontos de aquecimento que sugerem pela localização em sua maioria, que dois parâmetros correlatos estão envolvidos, densidade da população humana mais elevada e desenvolvimento social mais baixo.

Os meses de março e abril, que têm seus mapas representados por 12B e 12C na figura 12, apresentam os maiores números de densidade no comparativo

semestral, sendo 408.15100 e 409.435000 respectivamente, nos valores atribuídos à cor vermelha.

Os DSLeste e DSSul têm seus bairros, na sua maioria, representados pela coloração verde, quando a densidade semestral é comparada, observa-se como valor da menor densidade baixa o mês de junho com 20.727800 e 48.322600 em junho, como sendo o de maior valor da densidade baixa (Figura 12). Já os DSNorte e DSOeste são os distritos com o maior número de áreas aquecidas, que são representadas pela coloração vermelha, tendo valores máximo e mínimo de alta densidade, representados por 409.434000 em abril e 245.257000 em julho respectivamente.

Os distritos sanitários que tiveram maior densidade de ovos no acumulado dos seis meses do estudo, foram DSNortell e DSOeste, tendo bastantes áreas aquecidas que apresentaram valor de 1760.990000 na coloração vermelha (Figura 13).

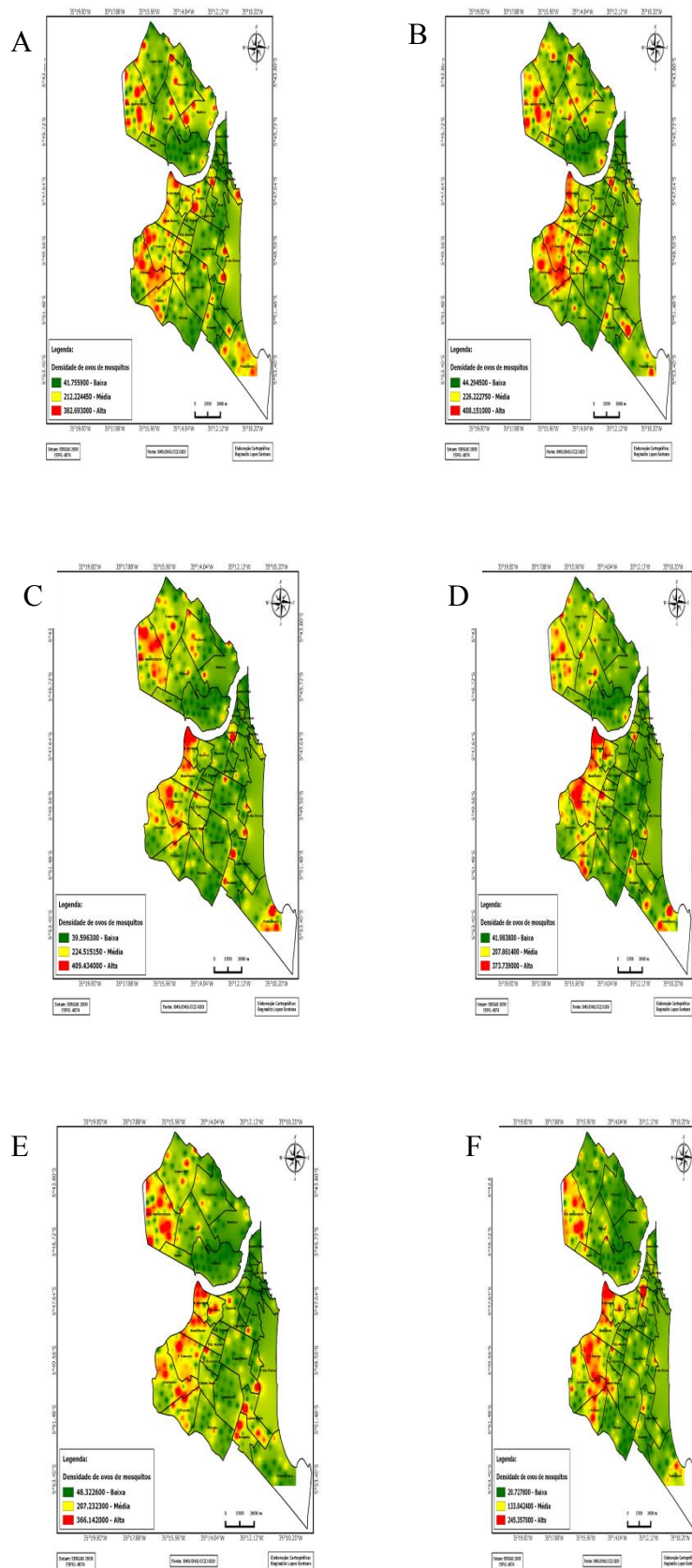


Figura 12. Mapa em Interpolação mostrando a evolução da densidade de ovos de *Aedes sp.* no Município de Natal-RN, onde A - E correspondem aos meses de

Fevereiro a Julho de 2016.

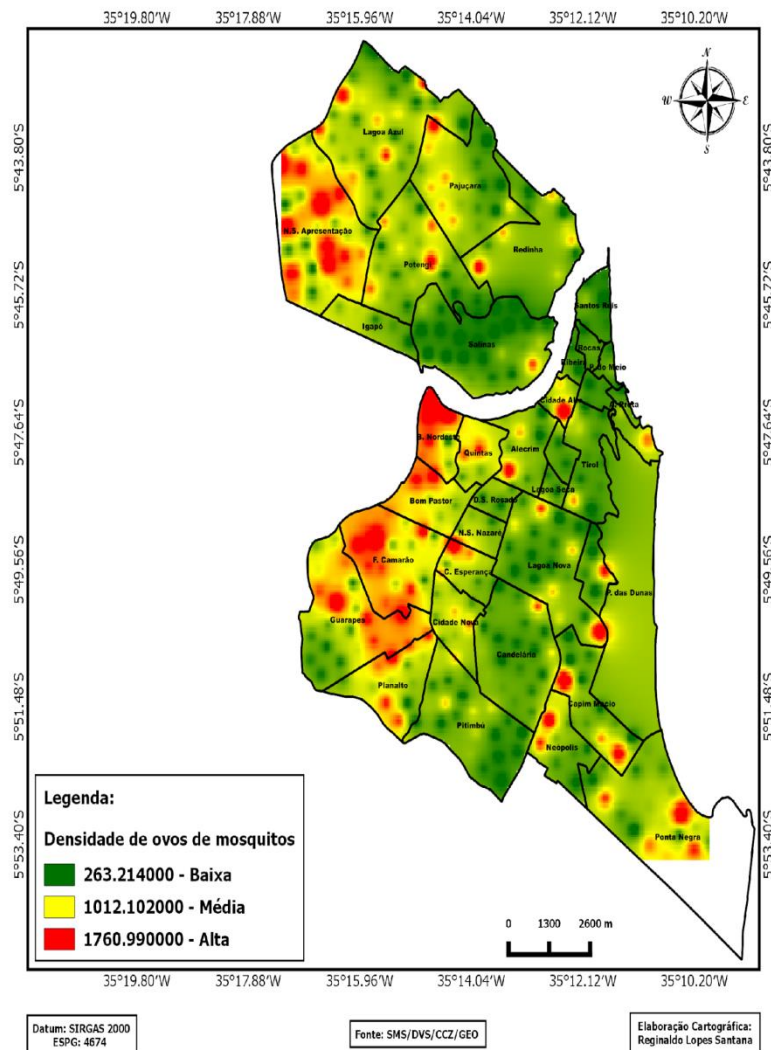


Figura 13. Mapa em Interpolação mostrando os resultados acumulados da densidade de ovos de *Aedes sp.*, no Município de Natal-RN.

4.4. Análise espacial dos humanos e vetores infectados por CHIKV

Ao observar os mapas da figura 14, consegue-se perceber que há uma maior concentração de pools positivos para CHIKV no DSNorte. Os pools com maior aquecimento (pools positivos com distância menor ou igual a cem metros de raio) também são observados no DSNorte. Tanto a quantidade de mosquitos por pool, quanto a distância entre estes, são influenciadores do aquecimento por Kernel.

Há identificação de um pool com 5 mosquitos *Wyeomyia spp.* positivo para CHIKV no mês de março, proveniente do bairro de Nova Descoberta (Mapas 14C e

14D da Figura 14).

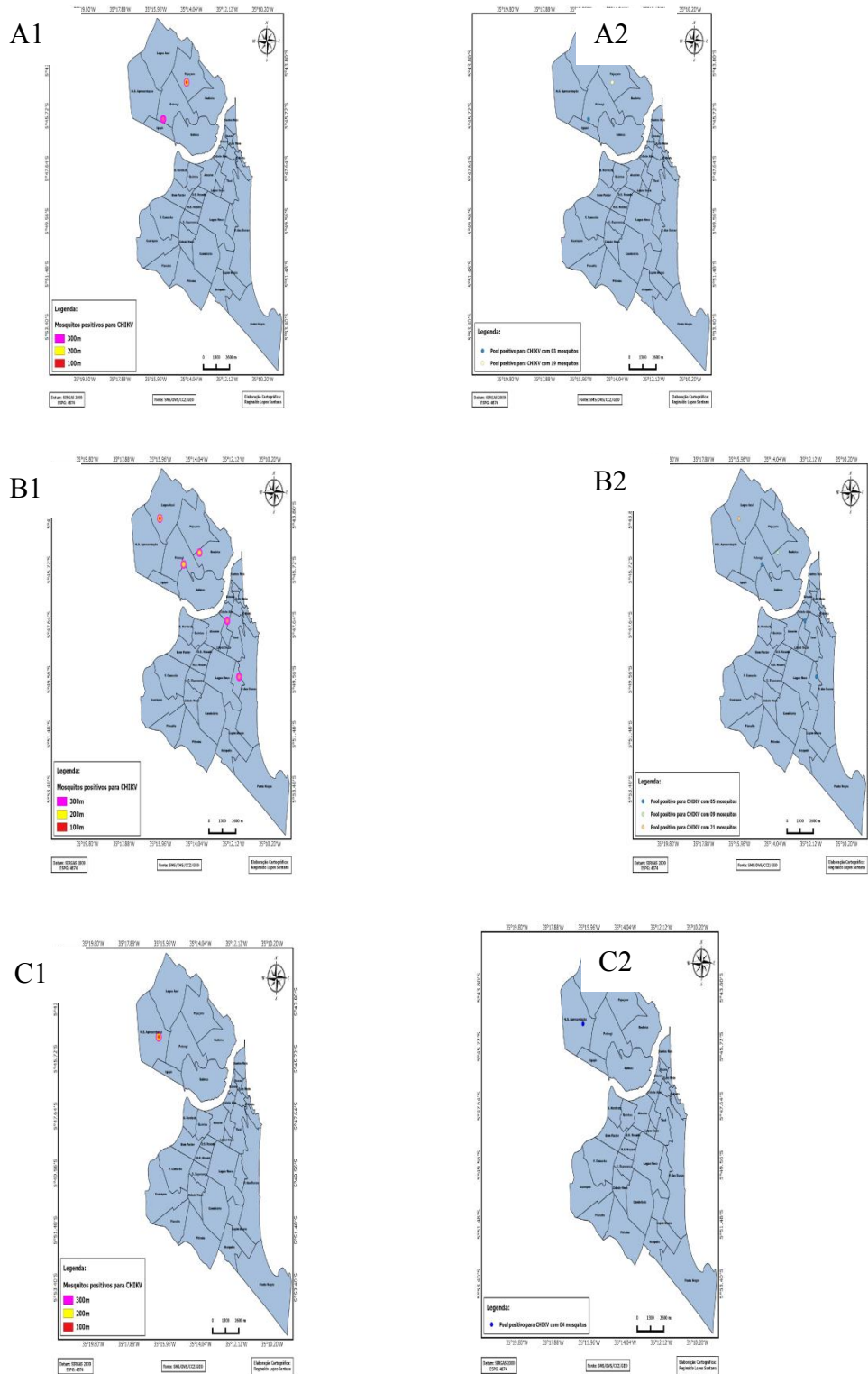


Figura 14. Mapas em Kernel e números de mosquitos por pool positivos para CHIKV no Município de Natal-RN, onde A1 e A2 representam o mês de Fevereiro, B1 e B2 o

mês de Março e C1 e C2 Julho.

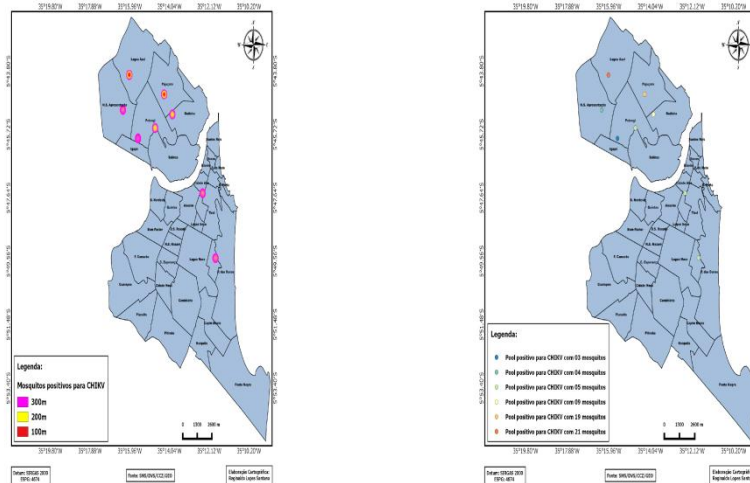


Figura 15. Mapas em Kernel e números de mosquitos por Pool positivos para CHIKV no Município de Natal-RN em acumulado.

Os mapas do quantitativo de humanos positivos para CHIKV revelam que março apresentou um maior número de casos, seguido por abril, com 23 e 11 humanos positivados, respectivamente. Os DSNorte I e II têm um maior número de áreas quentes (Figura 16 B1). O DSEste apresentou um surto considerável no bairro de Santos Reis em junho com três casos bem agrupados (Figura 16 F2). A figura 15 demonstra que todos os cinco distritos sanitários de Natal-RN tiveram casos humanos positivos para CHIKV confirmados laboratorialmente. O mês de junho apresentou o menor número de humanos positivados, tendo duas positificações, uma no DSNorte II e outra no DSSul.

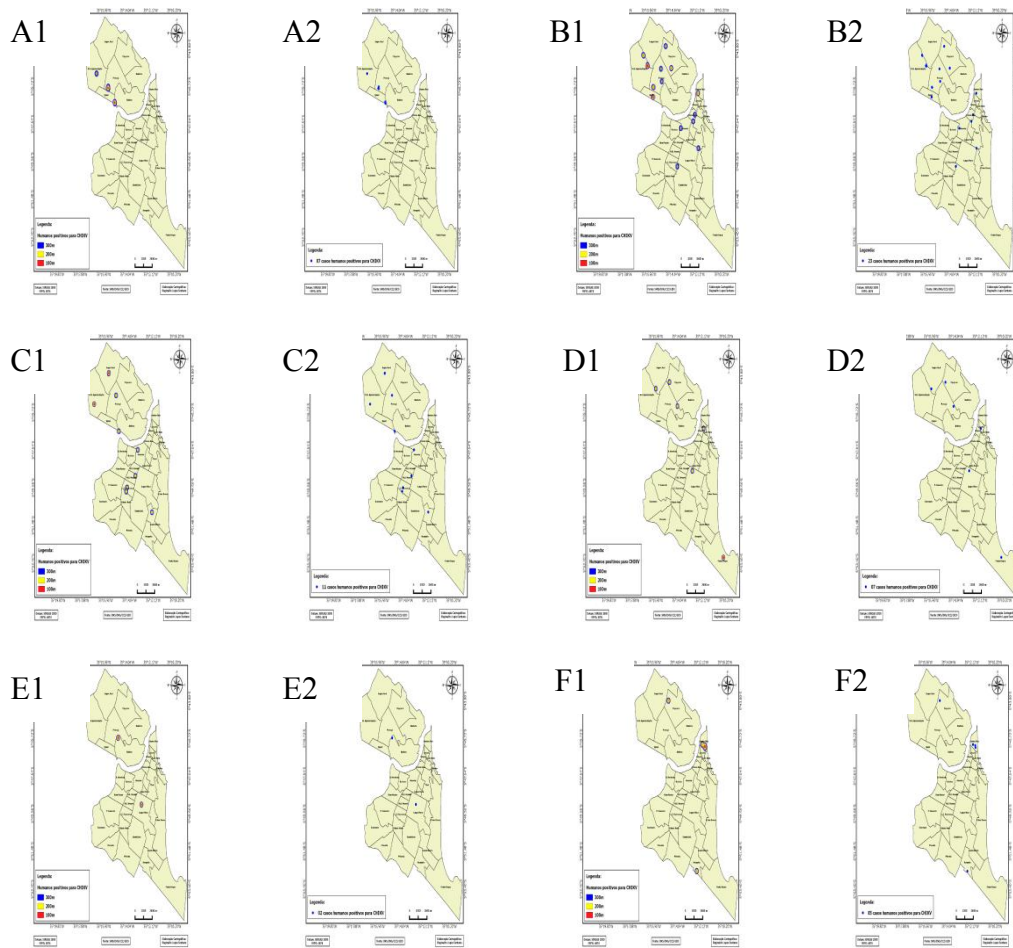


Figura 16. Mapas em Kernel e número de humanos positivos para CHIKV no Município de Natal-RN, onde as letras de A a F correspondem aos meses de Fevereiro a Julho.

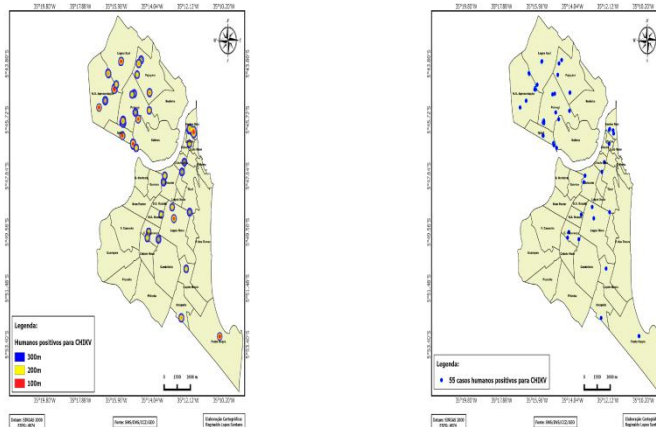


Figura 17. Mapas em Kernel e número de humanos positivos para CHIKV no Município de Natal-RN em acumulado.

A distribuição espacial dos humanos e vetores infectados por CHIKV e a análise da densidade de ovos de *Aedes sp.* no município de Natal-RN pode ser visualizada na figura 18. Os resultados estão dispostos em formato Kernel sobre Kernel.

Observa-se no primeiro mês do estudo (fevereiro - figura 18A) a epidemia por CHIKV estabelecida no Distrito Sanitário Norte (DSNorte II), sendo identificado tanto em humanos quanto em vetores. A figura 10B (março) mostra a explosão da epidemia, onde pode-se observar humanos e vetores infectados por CHIKV se alastrando pelos Distritos Sanitários Leste (DSLeste) e borda do Oeste (DSOeste). Cabe salientar que foram identificados *Wyeomyia sp* infectados por CHIKV na borda do DSSul (Bairro de Nova Descoberta) neste mês. A figura 18C (abril) mostra que a infecção se dissipa, porém, observa-se uma dinâmica da infecção saindo das bordas dos DSsul para o centro no Município sem expansão de casos humanos. Na figura 18D (maio) percebe-se que as extremidades norte e sul do município foram tomadas por casos humanos de CHIKV, especialmente no DSSul. O bairro de Ponta Negra apresentou sobreposição de densidade de ovos e casos positivados para CHIKV em humanos, já no mês de junho (figura 18E), observa-se que há dois pontos concentrados de casos humanos, um em Salinas que faz parte do DSNortell e o outro em Lagoa Nova, que corresponde ao DSSul, mas sem observação de alta densidade de ovos de mosquitos. Nos meses de junho e julho (Figuras 18E-F), pode-se observar uma diminuição de vetores e casos humanos positivos por CHIKV.

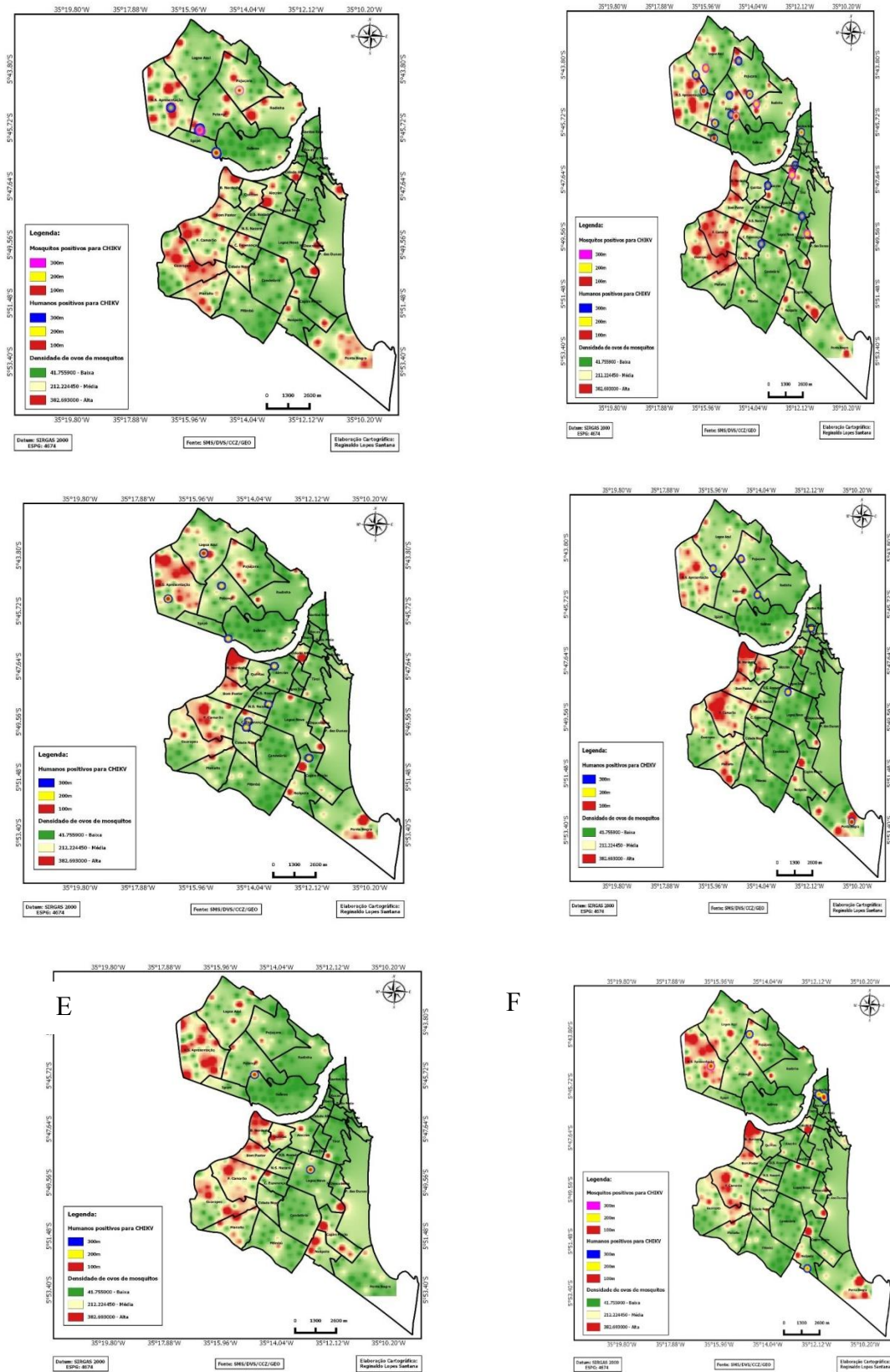


Figura 18. Mapa em Kernel mostrando a evolução do CHIKV em humanos e vetores e densidade de ovos de *Aedes sp.* no Município de Natal-RN.

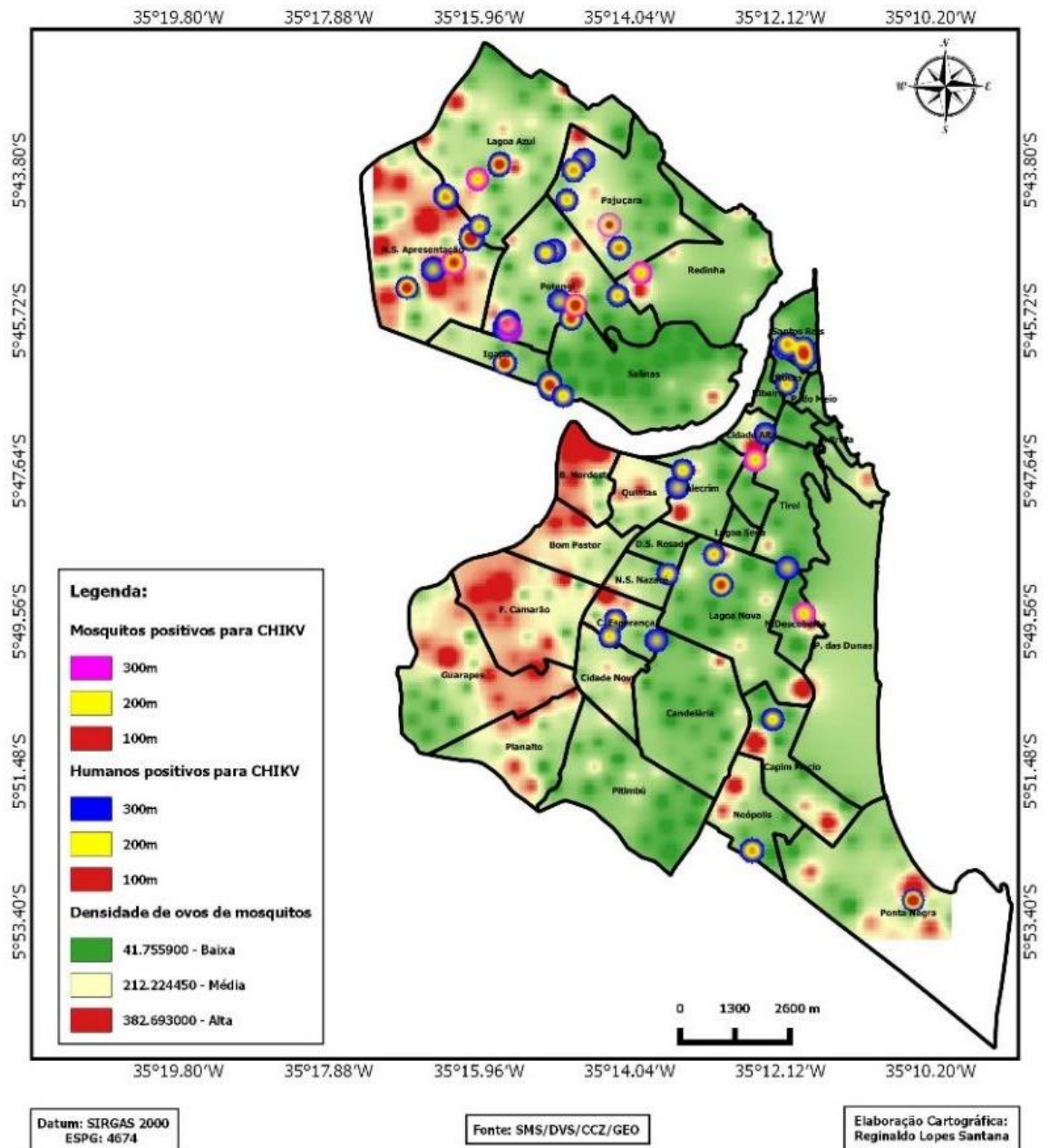


Figura 19. Mapa em Kernel mostrando os resultados deste estudo, a densidade de ovos de *Aedes sp.*, humanos e mosquitos infectados por CHIKV no Município de Natal-RN.

Na figura 19, referente a todo o período do acumulado, pode-se observar que a dinâmica da infecção acontece a despeito da densidade de ovos, tendo casos humanos por CHIKV com ou sem alta densidade de ovos de *Aedes sp.* Essas duas variantes são de extrema importância na dinâmica da infecção de CHIKV, podendo servir de modelo para a compreensão de outras arboviroses.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho traz como proposta a elaboração de um modelo de vigilância epidemiológica para arboviroses, inédito nos municípios do Brasil. Acredita-se que a combinação de ferramentas de vigilância, pesquisa viral por biologia molecular em humanos e vetores, índices de infestação vetorial, análise espacial com enfoque em incidência e dinâmica da população humana, possibilitam ações de controle em loco bem mais eficazes, diminuindo o impacto da epidemia.

Uma proposta colocada em prática neste estudo, foi testar a sensibilidade da busca ativa, efetuada por equipe de agentes de endemias multidisciplinar do Centro de Controle de Zoonoses de Natal/RN, de casos com síndrome febril sugestivos de infecção por CHIKV e de vetores adultos em pontos estratégicos dos cinco distritos sanitários de Natal-RN; além das ovitrampas instaladas em todo o município.

O *A. aegypti* como sendo o culicídeo de maior abundância vetorial nas capturas, sendo responsável por 51,59 % de todos os vetores capturados, corrobora com os dados encontrados por Sang *et al* (2008), onde 62,80 % foram dessa mesma espécie.

Ao se calcular o MIR para *A. aegypti*, infectados por CHIKV, obteve-se um valor de 11,87 que foi inferior aos 17,90, 23,10, 26,9, 17,30, 26,00 e 16,20 encontrados por Mbaika *et al* (2016) na porção ocidental do Quênia e superior aos 5,50 e 4,10 obtidos na região costeira daquele país. Essa mesma região teve outros valores de MIR em *A. aegypti* superiores aos encontrados neste trabalho, como 13,70, 22,40, 16,70 e 16,70. Ao se comparar o MIR obtido por Sang *et al* (2008), em Moçambique, nota-se que há índices superiores aos nossos resultados, como 30,80 e 47,60 e 2,10 respectivamente, dependendo da região.

Este trabalho levantou questões importantes sobre o possível papel do *A. albopictus* na transmissão do CHIKV no Brasil, em consonância com a transmissão de CHIKV na Ásia (PIALOUX *et al.*, 2007).

Neste estudo, foi possível identificar 1 pool da espécie *Wyeomyia sp* positivo para CHIKV, apresentando proporcionalmente a maior taxa de infecção mínima, um resultado inédito na literatura. Vale salientar que mosquitos da espécie *Wyeomyia* tem como habitat áreas silvestres, como a área do Parque da Dunas. Os pontos de coleta que contemplaram a captura desta espécie neste trabalho, foram locados em áreas de entorno da Mata Atlântica (Bairros de Nova Descoberta e Tirol) corroborando com Ceretti-Junior *et al* (2014), onde encontrou no mesmo bioma a forma imatura. Esse

resultado sugere que esta espécie de mosquito se infectou durante um repasto sanguíneo ocorrido nessa área limítrofe que contempla toda borda leste do bairro de Nova Descoberta. Apesar da relevância deste achado, não foi possível investigar a capacidade vetorial dos mosquitos da espécie *Wyeomyia sp* para a transmissão do vírus. Estudos adicionais são importantes para elucidar se há capacidade de transmissão vetorial por parte da espécie *Wyeomyia sp* e o seu papel como reservatório de arbovírus no Município de Natal-RN no ciclo silvestre da doença.

Das amostras positivadas para CHIKV em humanos, 34 foram mulheres e 23 foram homens, correspondendo a 59,65% e 40,35% respectivamente, dados que corroboram com os encontrados por Epstein (2007), onde 68% das pessoas infectadas na epidemia das Ilhas Reunion, eram do sexo feminino. Neste trabalho, foi observado que o pico epidêmico por CHIKV ocorreu entre as semanas epidemiológicas 7 e 15, onde os limites, máximo epidêmico e o início da entrada da curva em endemia, são representados por setas azuladas, corroborando com os resultados obtidos por Epstein (2007). Entretanto, este perfil foi diferente dos anos anteriores no Município de Natal, onde os picos epidêmicos ocorreram entre as semanas epidemiológicas 16 e 20 (Figura 12).

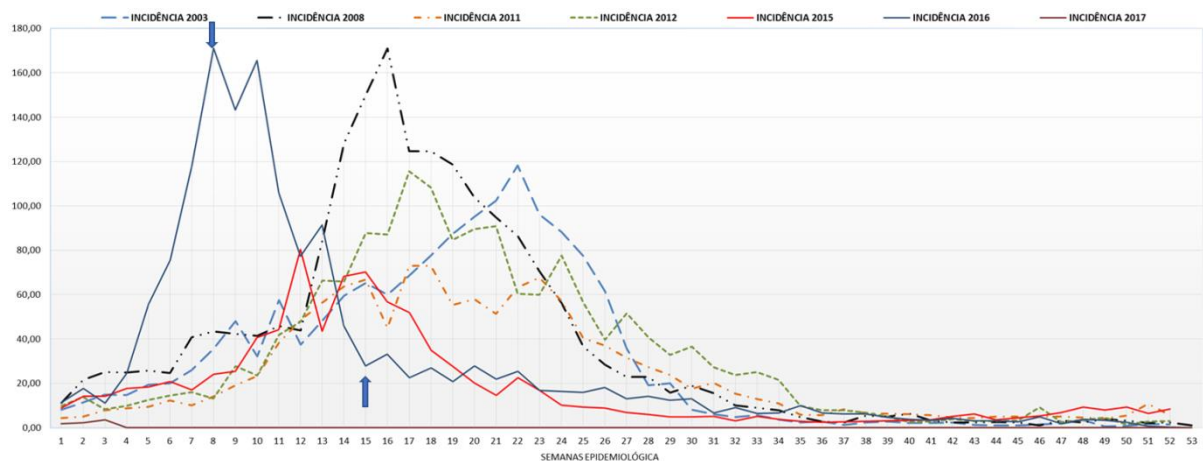


Figura 20. Perfil de epidemias para arboviroses notificadas no município de Natal-RN, Fonte: SMS/DVS/CCZ/NASRS.

Com os resultados de qRT-PCR entregues ao Centro de Controle de Zoonoses de Natal-RN em um intervalo de um mês entre a coleta e o processamento, permitiu traçar uma estratégia de controle focado em áreas quentes (áreas vermelhas dos mapas - figuras 9 e 10), modulando as forças de ação de controle vetorial, semelhante

aos modelos propostos por Vazquez-Prokopec *et al.*, (2010).

A competência vetorial é um parâmetro fundamental na avaliação do risco de transmissão e disseminação de CHIKV (VEGA-RÚA *et al.*, 2014). Porém não deve ser olhada como parâmetro de maior fomento financeiro para o controle das arboviroses e sim como fator cumulativo de área de risco. Os resultados apresentados nas figuras 9 e 10 deste estudo mostram que a densidade populacional de humanos e vetores em sinergia, impactam profundamente no curso do surto, sendo esta, pouco trabalhada em políticas diretas de bloqueio de transmissão.

Muitos dos pacientes investigados com sintomas de febre aguda foram negativos para CHIKV, mesmo coletados em tempo adequado, o que sugere a possível participação de outros patógenos de etiologia desconhecida ou não investigada neste trabalho. Outra limitação deste estudo foi o número limitado de pacientes coletados e, portanto, de amostras disponíveis. Devido à dinâmica do CHIKV e ao potencial de retorno de um mesmo paciente à rede hospitalar, de emergência ou não, para o CHIKV em Natal-RN, é importante implementar um sistema de vigilância maior que forneça informações valiosas sobre a prevalência e incidência da infecção e da circulação do CHIKV, essenciais para o planejamento de uma estratégia adequada de saúde do presente estudo.

Atualmente, o município de Natal dispõe de informações semanais para priorizar as ações e direcionar o trabalho dos agentes de combate às endemias nas áreas mais críticas de infestação e de transmissão. Ao reconhecer as áreas prioritárias, as análises indicam para onde devem ser direcionados às ações de controle, tornando-se uma importante ferramenta para a vigilância desses agravos (BARBOSA *et al.* 2017).

Ao se comparar os modelos de intervenções usados para controle de epidemias de arboviroses, no que tange os índices de densidade das formas imaturas, há uma grande diferença no número de servidores mobilizados. O município de Natal-RN efetuou um LIRAA em 2017 para fornecer dado comparativo ao Ministério da Saúde (MS), um só ciclo mobilizou diretamente 258 servidores. Vale salientar que o preconizado pelo MS são 6 ciclos anuais. Já o modelo descrito por Barbosa *et al.* (2017), 38 servidores podem gerar os dados que desempenham a mesma função do LIRAA, além do mais, os dados gerados são mais sensíveis e de mais precisão por serem mensais.

6. CONCLUSÃO

O modelo de vigilância de arbovírus em humanos e vetores proposto por esse trabalho forneceu informações precisas ao Centro de Controle de Zoonoses de Natal-RN sobre os locais com maior circulação de arbovírus. Essas informações permitiram direcionar ações locais de controle vetorial auxiliando as intervenções de tentativa de bloqueio da epidemia de CHIKV no Município de Natal durante o ano de 2016.

7. REFERÊNCIAS

AHOLA, T.; KAARIANEN. L. Reaction in alphavirus mRNA capping: formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl- GMP. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92:507–511.1995.

BARBOSA I. R. et al., Identificação de áreas prioritárias para a vigilância e controle de Dengue e outras arboviroses transmitidas pelo *Aedes aegypti* no município de Natal-RN: relato de experiência. **Epidemiol. Serv. Saúde** 26 (3) • Jul-Sep 2017.

BOSIO, C.F., et al. Quantitative Trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. **Genetics** 156, 687e698.2000.

BRIGHTON S.W.; PROZESKY O.W.; DE LA HARPE A.L. Chikungunya virus infection. A retrospective study of 107 cases. **South African Medical Journal** 1983;

CARVALHO M.S.; CÂMARA G., 2002. Análise de eventos pontuais. In S Druck, MS Carvalho, G Câmara and AMV Monteiro, Análise espacial de dados geográficos. Disponível em <http://www.dpi.inpe.br/gilberto/livro/analise/>. Acessado em 17 de setembro de 2003.

CERETTI-JUNIOR W. et al., Species Composition and Ecological Aspects of Immature Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Bromeliads in Urban Parks in the City of São Paulo, Brazil **Jornal Arthropod-Borne Dis**, 10(1): 102–112, March 2016.

CHEVREUX B. et al. Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs. **Genome Res.**;14:1147–59.2004.

CHOW V.T. et al. Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. **Am Jornal Tropical Medicine Hyg.**; 58: 578–86.1998.

CHVALA, S. et al. Monitoring of Usutu virus activity and spread by using dead bird

surveillance in Austria, **Veterinary Microbiology Journal**. 122, 237–245.2007.

CLETON N. et al. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. **Jornal Clinical of Virology**. Nov;55(3):191-203.2012.

EPSTEIN P.R. Chikungunya fever resurgence and global warming. **Am Jornal Tropical Medicine Hyg**; 76: 403–04, 2007.

FAYE, O. et al. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught Mosquitoes. **Virology Journal**, [S.l.], v. 10, n. 1, p. 311, 2013.

FOY, B. D., et al. Development of an algorithm for production of inactivated arbovirus antigens in cell culture, **Jornal of Virological Methods**, 208 66-78 Jun 2014.

FOURIE E.D.; MORRISON J.G. Rheumatoid arthritic syndrome after Chikungunya fever. **South African Medicine Jornal**.1979.

HOCHEDÉZ P. et al. Chikungunya infection in travelers. **Emergent Infect Disises**2006;

HONÓRIO, N. A. et al. Chikungunya: an arbovirus infection in the process of establishment and expansion in Brazil. **Cad. de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 906–908, 2015.

JOHNSON A.J. et al. Duplex microsphere-based immunoassay for detection of anti-West Nile virus and anti-St. Louis encephalitis virus immunoglobulin m antibodies. **Clinical Diagnose Laboratory Immunological**. May;12(5):566-74.2005.

KELSALL J. E.; DIGGLE P. J. Non-parametric estimation of spatial variation in relative risk. **State Mededical**, 14: 2335-2342.1995.

KOH L. P.; SODHIL N. S. Importance of reserves, fragments, and parks for butterfly conservation in tropical urban landscape. **Ecol Appl**. 14(6): 1698–1708, 2004.

LAM S. K. et al. Chikungunya infection—an emerging disease in Malaysia. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, 2001.

LANCIOTTI, R. S. et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 5, p. 764–7, 2007.

LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.l.],v.30, n.3, p. 545–551, 1992.

LASTARZA M. W.; GRAKOUIA.; RICED C. M. Deletion and duplication mutations in the C-terminal nonconserved region of Sindbis virus nsP3: effects on phosphorylation and on virus replication in vertebrate and invertebrate cells. **Virology journal** 202:224–232. 1994.

LEPARC-GOFFART I. et al. Chikungunya in the Americas. **Lancet.**;383:514.2014.

LI, G. P. et al. Phosphorylation of Sindbis virus nsP3 in vivo and in vitro. **Journal of Virology** 179:416–427. 1990.

MCINTYRE N. E. Ecology of urban arthropods: a review and a call to action. **Ann Entomol Soc Am.** 93(4): 825–835, 2000.

MCKINNEY M. L. Effects of urbanization on species richness: a review of plants and animals. **Urban Ecosyst.** 11(2): 161–176, 2008.

MORSE, S.S., Factors in the emergence of infectious diseases. **Emerg. Infect. Dis.** 1, 7–15. 1995.

NIMMANNITYA S.; HALSTEAD S. B.; COHEN S. N; MARGIOTTA M. R. Dengue and Chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962–1964. I. Observations on hospitalized patients with hemorrhagic fever. **Am J Trop Med Hyg.** 1969.

NUNES, M. R. T. et al, Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil **BMC Medicine** 13:102 DOI 10.1186/s12916-015-0348-x, 2015.

OZDEN S. et al. Human muscle satellite cells as targets of Chikungunya virus infection. **PLoS ONE** 2 (6): e527.2007.

Pan American Health Organization. Chikungunya. Washington, DC: PAHO. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=343&Itemid=40931.

PADBIDRI V. S.; GNANESWAR T. T. Epidemiological investigations of Chikungunya epidemic at Barsi, Maharashtra state, India. **J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol**; 23: 445–51.1979.

PERÄNEN, J. et al.. Nuclear localization of Semliki Forest virus-specific nonstructural protein nsP2. **Jornal of Virology**. 64:1888–1896.1990.

PIALOUX G. et al. Chikungunya, an epidemic arbovirosis, *Maladies Infectieuses et Tropicales*, Paris, France Hôpital Tenon, service des **Lancet Infect Dis**; 7: 319–27. 2007.

Probable Non–Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • Vol. 17, No. 5, May 2011

QUATRESOUS I. E-alert 27 January: Chikungunya outbreak in Reunion, a French overseas department. **Euro Surveill**2006;

RIKKONEN, M.; PERÄNEN J.; KÄÄRIÄINEN L. ATPase and GTPase activities associated with Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. **Jornal of Virology**. 68:5804–5810.1994.

RICE C. M.; STRAUSS J. H. Nucleotide sequence of the 26S mRNA of Sindbis virus

and deduced sequence of the encoded virus structural proteins. **Proc Natl Acad Sci USA** 1989; 78:2062-2066.

ROBINSON M. C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–53. I. Clinical features. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1955.

ROSENBERG, R. et al, Search strategy has influenced the discovery rate of human viruses. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 110, 13961–13964. 2013.

RUBACH, J. K. et al, Characterization of purified Sindbis virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase activity in vitro. **Virology** 384:201–208. 2009.

RUST R. S., Human arboviral encephalitis. **Seminary Pediatric Neurology.** Sep;19(3):130-51. 2012.

SABEL C. E. et al, Modelling exposure opportunities: estimating relative risk for motor neurone disease in Finland. **Soc Sci Med**, 50: 1121-1137. 2000.

SANTOS S. M. et al, Detecção de aglomerados espaciais de óbitos por causas violentas em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 1996. **Caderno Saúde Pública**, 17: 1141-1151. 2001.

SANTOS N. S. et al. *Viroses Multissistêmicas*. In: Santos N. S. et al. **Virologia Humana**. 3. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2015.

SANG R. C. et al., Entomologic Investigations of a Chikungunya Virus Epidemic in the Union of the Comoros (2005), **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 78(1), pp. 77–82, 2008.

SAXENA S. et al, Resurgence of Chikungunya virus in India: an emerging threat. **Euro Surveill.** 2006.

Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Monitoramento dos casos de dengue, febre de Chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 51, 2016.

Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde.

Volume 48, N° 2, 2017.

SCHUFFENECKER I. et al, Genome microevolution of Chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. **PLoS Med.** 3 (7): e263.July 2006.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, M. DA S. Monitoramento dos casos de dengue Semana Epidemiológica (SE) 35 e febre de Chikungunya SE 36 de 2014. **Boletim Epidemiológico**, v. 45, n. 20, 2014.

STAPLES J. E.; FISCHER M. “Chikungunya virus in the Americas—what a vectorborne pathogen can do”. **N. Engl. J. Med.** 371 (10): 887–9.2014.

STRAUSS, E. G. et al, Identification of the active site residues in the nsP2 proteinase of Sindbis virus. **Virology**191:932–940.1992.

STRAUSS J. H.; STRAUSS E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiology Revista**1994; 58: 491–562.

SOUMAHORO M. K. et al, Imported Chikungunya virus infection. **Emerg Infect Dis.**;16:162–3.2010.

SURANJITH L. et al, International Society of TravelMedicine, 1195-1982. **J Travel Med.**;14:320–5.5, 2007.

TSETSARKIN K. A. et al, A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS Path.** 3:e201.2007.

TSETSARKIN K. A. et al. Multi-peaked adaptive landscape for Chikungunya virus evolution predicts continued fitness optimization in *Aedes albopictus* mosquitoes. **Nat Commun.**;5:4084, 2014.

TSETSARKIN K. A. et al. Interspecies transmission and Chikungunya virus

emergence. **Curr Opin Virol.**;16:143-50, 2016.

VAZQUEZ-PROKOPEC G. M. et al. Quantifying the Spatial Dimension of Dengue Virus Epidemic Spread within a Tropical Urban Environment. **PLoS Negl Trop Dis** 4(12): e920. doi:10.1371/journal.pntd.0000920, 2010.

VIHINEN, H.; SAARINEN J. Phosphorylation site analysis of Semliki forest virus nonstructural protein 3. **J. Biol. Chem.** 275:27775–27783.2000.

VIHINEN, H. et al. Elimination of phosphorylation sites of Semliki Forest virus replicase protein nsP3. **J. Biol. Chem.** 276:5745–5752.2001.

VOLK, S. M. et al. Genome-scale phylogenetic analyses of Chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. **J. Virol.** 84, 6497e6504.2010.

WANG, Y.-F.; SAWICKIS. G.; SAWICKI D. L. Alphavirus nsP3 functions to form replication complexes transcribing negative-strand RNA. **J. Virol.** 68:6466–6475.1994.

WEAVER S. C. Arrival of Chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. **PLoS Negl Trop Dis.**;8, e2921.2014.

WENGLER, G. The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. **Virology**197:265–273. 1993.

World Health Organization, Zoonoses and Veterinary Public Health (cited 25 September 2008). Available from <http://www.who.int/zoonoses/en>, 2008.

WHITE L. K. et al. “Chikungunya virus induces IPS-1-dependent innate immune activation and protein kinase R-independent translational shutoff”. **J. Virol.** 85 (1): 606–20. January 2011.

Yap M. L. et al. Structural studies of Chikungunya virus maturation. **PNAS** 26, 2017

114 (52) 13703-13707.

8. Anexos



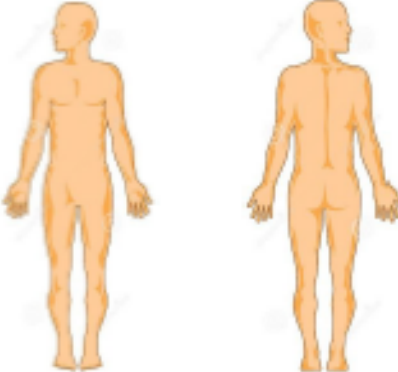
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
SECRETARIA ADJUNTA DE ATENÇÃO INTEGRAL À SAÚDE
DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
CENTRO DE CONTROLE DE ZOONOSES
NÚCLEO DE ANÁLISE DE SITUAÇÃO DE RISCO EM SAÚDE
VIGILÂNCIA DAS ARBOVIROSES
FICHA DE INVESTIGAÇÃO DE CAMPO

AGRAVO SUSPEITO	
<input type="checkbox"/> Dengue	<input type="checkbox"/> Chikungunya
<input type="checkbox"/> Zika	<input type="checkbox"/> Outros

DADOS GERAIS	NOME: _____	NÚMERO: _____	QUATEIRÃO: _____
	ENDEREÇO: _____	BAIRRO: _____	
	COMPLEMENTO: _____		
	FONE: _____	REFERÊNCIA: _____	
	COORDENADAS: X _____ Y _____		
	DATA DE 1ª SINTOMAS: __/__/__	DATA DE NOTIFICAÇÃO: __/__/__	DATA DE NASCIMENTO: __/__/__
	SEXO: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F	IDADE: _____	RAÇA: _____
		GESTANTE: <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N	IDADE GESTACIONAL: _____
	ESCOLARIDADE: _____	Nº CARTÃO SUS: _____	
	PROFISSÃO: _____	BAIRRO: _____	
NOME DA MÃE: _____	BAIRRO DE RES.: _____		
ESTEVE EM ÁREA DE TRANSMISSÃO/VIAJOU NOS ÚLTIMOS 15 DIAS: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
LOCAL 1: _____	DATA CHEGADA: __/__/__	DATA SAÍDA: __/__/__	
LOCAL 2: _____	DATA CHEGADA: __/__/__	DATA SAÍDA: __/__/__	
LOCAL 3: _____	DATA CHEGADA: __/__/__	DATA SAÍDA: __/__/__	
LOCAL 4: _____	DATA CHEGADA: __/__/__	DATA SAÍDA: __/__/__	
RECEBEU ALGUM PARENTE/AMIGO NOS ÚLTIMOS 15 DIAS: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
LOC. RES. 1: _____	DATA CHEGADA: __/__/__	DATA SAÍDA: __/__/__	
LOC. RES. 2: _____	DATA CHEGADA: __/__/__	DATA SAÍDA: __/__/__	
LOC. RES. 3: _____	DATA CHEGADA: __/__/__	DATA SAÍDA: __/__/__	
LOC. RES. 4: _____	DATA CHEGADA: __/__/__	DATA SAÍDA: __/__/__	
LOCAL PROVÁVEL DE INFECÇÃO: _____			

DADOS CLÍNICOS	SINTOMAS APARÊNTES? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	DIAS					OBSERVAÇÕES:
	<input type="checkbox"/> ARTRITE	1	2	3	4	5	
	<input type="checkbox"/> ARTRALGIA						
	<input type="checkbox"/> EDEMA PERI ARTICULAR						
	<input type="checkbox"/> FEBRE						
	<input type="checkbox"/> VÔMITO						
	<input type="checkbox"/> SANGRAMENTO DE MUCOSA						
	<input type="checkbox"/> DOR ABDOMINAL						
	<input type="checkbox"/> CEFALÉIA						
	<input type="checkbox"/> MANIFESTAÇÕES CUTÂNEAS						
	<input type="checkbox"/> DOR NAS COSTAS						
	<input type="checkbox"/> MENINGOENCEFALITE						
	<input type="checkbox"/> NÁUSEA						
	<input type="checkbox"/> CONJUNTIVITE						
	<input type="checkbox"/> VERTIGENS						
<input type="checkbox"/> MIALGIA							
<input type="checkbox"/> DOR RETRO ORBITAL							
<input type="checkbox"/> FOTOFOBIA							
<input type="checkbox"/> PRURIDO							
<input type="checkbox"/> OUTROS							

ANEXO A- Frente da ficha de investigação de campo.

<p>MARCAR (CIRCULAR) AS ÁREAS AFETADAS NO MODELO AO LADO E ESCREVER, DE ACORDO COM O SEGUINTE:</p> <p>D (DOR);</p> <p>E (EDEMA);</p> <p>DA (DEGRADAMENTO ARTICULAR);</p> <p>V (VERMELHIDÃO)</p> <p>UMA MESMA ARTICULAÇÃO PODE SER MARCADA COM MAIS DE UMA LETRA.</p>																											
<p>CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA:</p> <p><input type="checkbox"/> DENGUE <input type="checkbox"/> DENGUE COM SINAIS DE ALARME <input type="checkbox"/> DENGUE GRAVE</p> <p><input type="checkbox"/> AGUDA <input type="checkbox"/> MODERADO <input type="checkbox"/> CRÔNICO</p>																											
<p>INFORMAÇÕES ADICIONAIS:</p>																											
OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES	<p>PROCUROU AJUDA MÉDICA? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO DATA: __/__/__</p>			<p>OCORREU HOSPITALIZAÇÃO? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO</p>																							
	<p>NOME DO HOSPITAL? _____</p>		<p>MUNICÍPIO: _____ UF: _____</p>																								
	<p>NOME DO HOSPITAL? _____</p>		<p>DATA DE INTERNAÇÃO: __/__/__ DATA DE ALTA: __/__/__</p>																								
	<p>ALGUMA DOENÇA DE BASE? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO QUAL? _____</p>																										
	<p>MEDICAÇÃO DE USO CONTINUO? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO QUAL? _____</p>																										
DADOS LABORATORIAIS	<p>EXAME SOROLÓGICO (IgM): <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO DATA DE COLETA: __/__/__ RESULTADO: _____</p>		<p>EXAME SOROLÓGICO (IgG): <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO DATA DE COLETA: __/__/__ RESULTADO: _____</p>																								
	<p>EXAME NSI: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO DATA DE COLETA: __/__/__ RESULTADO: _____</p>		<p>RT-PCR: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO DATA DE COLETA: __/__/__ RESULTADO: _____</p>																								
	<p>ISOLAMENTO VIRAL: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO DATA DE COLETA: __/__/__ RESULTADO: _____</p>		<p>SOROTIPO: <input type="checkbox"/> DEN-1 <input type="checkbox"/> DEN-2 <input type="checkbox"/> DEN-3 <input type="checkbox"/> DEN-4</p>																								
	<p>CRITÉRIO DE CONFIRMAÇÃO: <input type="checkbox"/> LABORATÓRIO <input type="checkbox"/> CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO <input type="checkbox"/> EM INVESTIGAÇÃO</p>																										
	<p>OBS.: _____</p>																										
	<p>ENTOMOLOGIA</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2"><i>Aedes aegypti</i></th> <th colspan="2"><i>Aedes albopictus</i></th> <th colspan="2"><i>Culex quin</i></th> <th colspan="2">Outros</th> </tr> <tr> <th>M</th> <th>F</th> <th>M</th> <th>F</th> <th>M</th> <th>F</th> <th>M</th> <th>F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>				<i>Aedes aegypti</i>		<i>Aedes albopictus</i>		<i>Culex quin</i>		Outros		M	F	M	F	M	F	M	F							
<i>Aedes aegypti</i>		<i>Aedes albopictus</i>		<i>Culex quin</i>		Outros																					
M	F	M	F	M	F	M	F																				
<p>UNIDADE NOTIFICADORA: _____ CNES: _____</p>		<p>TÉCNICO RESPONSÁVEL PELAS INFORMAÇÕES: _____ DATA: __/__/__</p>																									
<p>TÉCNICO RESPONSÁVEL PELA DIGITAÇÃO: _____</p>		<p>DATA: __/__/__</p>																									

ANEXO B- Verso da ficha de investigação de campo.