

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

LEONARDO VINÍCIUS DA SILVA LIMA

**ANÁLISE MOLECULAR DO VÍRUS CHIKUNGUNYA EM VETORES:
IMPLICAÇÕES PARA VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA EM ALAGOAS**

RIO LARGO - AL

2024

LEONARDO VINÍCIUS DA SILVA LIMA

**ANÁLISE MOLECULAR DO VÍRUS CHIKUNGUNYA EM VETORES:
IMPLICAÇÕES PARA VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA EM ALAGOAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador(a): Dra. Thais Fernanda de Campos Fraga-Silva.

Coorientador: Dr. Abelardo Silva-Junior.

Rio Largo - AL

2024

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Polo Viçosa
Bibliotecário Responsável: Stefano João dos santos

L732 Lima, Leonardo Vinicius da Silva

Análise molecular do vírus chikungunya em vetores:
implicações para vigilância epidemiológica em Alagoas / Leonardo Vinicius
da Silva Lima - 2025.
50f. ; il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de
Alagoas, Campus Ceca, Polo Viçosa, 2025.
Orientação: Prof. Dra. Thais Fernanda de Campos Fraga-Silva

Inclui bibliografia.

Chikungunya. 2. Alagoas. I. Abelardo Silva Junior
CDU: 636.1

Folha de Aprovação

LEONARDO VINÍCIUS DA SILVA LIMA

ANÁLISE MOLECULAR DO VÍRUS CHIKUNGUNYA EM VETORES: IMPLICAÇÕES
PARA VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA EM ALAGOAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - PPGCA/CECA da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Aprovado em: 26/02/2025.

Banca Examinadora:

Dra. Thais Fernanda De Campos Fraga Da Silva

(Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Alagoas)

Professor Doutor Fernando Nogueira de Souza

(Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Alagoas)

Professora Doutora Letícia Anderson Bassi

(Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas)

Dedico este trabalho a todas as pessoas que enfrentaram ou enfrentam os desafios impostos pela chikungunya, demonstrando força e resiliência. Também dedico este esforço aos profissionais de saúde, pesquisadores e agentes comunitários, que lutam diariamente à prevenção, ao cuidado e à busca por soluções para mitigar o impacto dessa doença.

Que este estudo possa contribuir, ainda que modestamente, para a conscientização e o combate à chikungunya, ajudando a construir um futuro mais saudável para todos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a toda a comunidade de Maceió, Maragogi, Viçosa e União dos Palmares por nos acolher e permitir a realização deste trabalho, demonstrando respeito e confiança com os esforços científicos para a melhoria de todos.

Agradeço a todas as equipes de agentes de endemias que cederam seu tempo e foram para a linha de frente, permitindo assim que o estudo fosse realizado.

Agradeço à secretaria municipal de saúde de Maceió - AL, pelo acolhimento e por disponibilizar meios necessários para que a pesquisa realizada no município fosse realizada com maestria.

Ao Laboratório Central de Saúde Pública de Alagoas (LACEN/AL) pelo suporte essencial fornecido durante a pesquisa. Minha profunda gratidão também ao Jean, a Mykaella e ao Magliones, cujo comprometimento e expertise na condução das análises moleculares foram fundamentais para o desenvolvimento deste estudo. O empenho e a dedicação de cada um foram indispensáveis para a realização dos experimentos, contribuindo significativamente para o avanço do nosso trabalho.

Ao Laboratório de Pesquisa em Virologia e Imunologia (LAPEVI), e todos os meus amigos que dividiram seus dias, resenhas, estresses e momentos felizes comigo, encerro esse ciclo com a certeza de que tê-los no meu dia a dia tornou tudo mais leve. Em especial, ao Prof. Dr. Abelardo Silva-Júnior por me ensinar tanto e ser essa pessoa incrível e doce com todos os seus orientandos. Muito obrigado por ser essa pessoa incrível e espero muito que continue sendo assim! Agradeço aos meus amigos Camila, Grazi, Júlia, Luccas e Michel, que fizeram parte desse estudo, que me ensinaram muita coisa e me aguentaram muito durante esses anos de pesquisa, não sei o que teria sido de mim sem vocês.

Deste ponto, gostaria de agradecer primeiramente a Profa. Dra. Thais Fernanda de Campos Fraga da Silva, minha orientadora, pois ela é o motivo de termos chegado até aqui. De fato, a pesquisa não teria o sentido que tem se não fosse pela orientação e dedicação que ela deu e que todos os ensinamentos e puxões de orelha, que serão levados comigo na minha vida profissional e pessoal. Muito obrigado!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, por compartilhar todo o conhecimento que tinham para auxiliar na minha formação como pesquisador.

Aos meus familiares, agradeço imensamente por toda confiança e energia positiva depositados em mim. Vocês são meu alicerce, meu ponto de apoio e a minha esperança, amo vocês de forma inexpressiva. À minha mãe, agradeço da forma mais pura possível, pois todos os dias fui incentivado a continuar realizando o que eu gosto e sendo essa pessoa que ela me ensinou a ser. Obrigado mãe!

À FAPEAL– Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas, pelo apoio financeiro concedido durante a elaboração deste estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um arbovírus que causa a febre chikungunya, doença transmitida por mosquitos *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus* e identificado pela primeira vez em 1950 na Tanzânia, CHIKV pertence à família *Togaviridae* e ao gênero *Alphavirus*. No Brasil, dois diferentes genótipos do CHIKV circulam em diferentes regiões do país, tendo como predominante nos dias atuais o genótipo Leste-Central-Sul-Africano (ECSA), principalmente na região Nordeste. O município de Maceió foi o segundo da região Nordeste com maior registro de casos prováveis da febre chikungunya, que corresponde a 5.908 casos (572,7 casos/100 mil hab.). A circulação de diferentes genótipos aumenta o risco de coinfeções e eventos de recombinação genética, promovendo mutações que podem impactar a infectividade viral, a eficiência de disseminação e a transmissão entre distintos vetores. Assim, a vigilância contínua do vírus, principalmente em áreas de alto risco que possuem o vetor endêmico, juntamente com dados genômicos, pode fornecer informações oportunas para orientar respostas eficazes de saúde pública. Portanto, nosso objetivo Neste contexto, nosso objetivo é estudar a epidemiologia do CHIKV em *Aedes aegypti* de quatro municípios do estado de Alagoas. Para tanto, amostras de vetores coletados nas regiões epidêmicas foram submetidas à análises moleculares através de RT-qPCR para identificação de divergências moleculares em relação a cepas previamente existentes. As análises moleculares foram realizadas em fêmeas individualizadas e pools de até cinco machos de *Ae. aegypti*. Para criação de uma hipótese filogenética da circulação do vírus foi realizado um levantamento de 25 sequências genômicas de CHIKV em vetores e 569 sequências isoladas de humanos de 4 (quatro) Estados brasileiros retirados do banco de dados do GISAID para relacionar à surtos anteriores. Foram coletados 1052 mosquitos e pudemos detectar, a partir de análises moleculares, o CHIKV em quatro vetores coletados no Bairro de Ponta Verde, no município de Maceió, tornando-se o primeiro estudo realizado em Alagoas que detectou o vírus circulante em mosquitos. Através da análise filogenética foi possível identificar que o genótipo ECSA continua circulando nos quatro Estados e analisados e o agrupamento de sequências isoladas em vetores indicou que algumas linhagens de CHIKV estão sendo mantidas em certas regiões ao longo do tempo, enquanto outras aparecem em um curto período e desaparecem. Diante dos achados deste estudo, reforça-se a importância da vigilância contínua do CHIKV e de seu vetor, especialmente em regiões endêmicas, a fim de compreender melhor a dinâmica de circulação do vírus e mitigar possíveis surtos. Além disso, novas investigações são necessárias para aprofundar o conhecimento sobre a evolução viral e seus impactos na saúde pública.

Palavras-chave: Chikungunya, Vetor, Vigilância epidemiológica, Saúde pública.

ABSTRACT

The Chikungunya virus (CHIKV) is an arbovirus that causes chikungunya fever, a disease transmitted by *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes. First identified in 1950 in Tanzania, CHIKV belongs to the *Togaviridae* family and the *Alphavirus* genus. In Brazil, two different CHIKV genotypes circulate in various regions, with the East-Central-South-African (ECSA) genotype currently predominant, especially in the Northeast. The municipality of Maceió had the second-highest number of probable chikungunya fever cases in the Northeast, totaling 5,908 cases (572.7 cases per 100,000 inhabitants). The circulation of different genotypes increases the risk of coinfections and genetic recombination events, promoting mutations that can impact viral infectivity, dissemination efficiency, and transmission across different vectors. Therefore, continuous surveillance of the virus, particularly in high-risk areas with endemic vectors, along with genomic data, can provide timely information to guide effective public health responses. In this context, our objective is to study the epidemiology of CHIKV in *Aedes aegypti* from four municipalities in Alagoas. Vector samples from epidemic regions were analyzed through RT-qPCR to identify molecular divergences in relation to previously existing strains, with molecular analyses conducted on individual female mosquitoes and pools of up to five males. To establish a phylogenetic hypothesis on viral circulation, a dataset of 25 CHIKV genomic sequences from vectors and 569 sequences isolated from humans across four Brazilian states was retrieved from the GISAID database to correlate with previous outbreaks. A total of 1,052 mosquitoes were collected, and CHIKV was detected in four vectors from the Ponta Verde neighborhood in Maceió, marking the first study in Alagoas to detect the circulating virus in mosquitoes. Phylogenetic analysis revealed that the ECSA genotype continues to circulate in the four analyzed states, and sequence clustering indicated that some CHIKV lineages persist in specific regions over time, while others emerge briefly and disappear. These findings reinforce the importance of continuous CHIKV and vector surveillance, especially in endemic regions, to better understand the virus's circulation dynamics and mitigate potential outbreaks, while also highlighting the need for further studies on viral evolution and its public health impact.

Keywords: Chikungunya, Vector, Epidemiological surveillance, Public health.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 FEBRE CHIKUNGUNYA.....	13
2.2 VÍRUS CHIKUNGUNYA	14
2.3 HISTÓRICO DO VÍRUS CHIKUNGUNYA	16
2.4 EPIDEMIOLOGIA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA	18
2.5 VETORES.....	20
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
4. ARTIGO.....	25
5. REFERÊNCIAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

A febre de chikungunya é uma doença infecciosa causada por um arbovírus e é transmitida através de um vetor artrópode, especificamente por mosquitos do gênero *Aedes*. A infecção é desencadeada por um vírus de RNA da família *Togaviridae* e gênero *Alphavirus*, conhecido como vírus Chikungunya (CHIKV).

O CHIKV é caracterizado por um genoma de RNA de fita simples e sentido positivo, codificando proteínas estruturais e não estruturais essenciais para sua replicação e infectividade. A doença associada ao vírus, inicialmente limitada a regiões da África e do sudeste asiático, alcançou proporções epidêmicas nas Américas desde 2013, com surtos relatados em diversos países, incluindo o Brasil, onde o Nordeste se destaca como uma das áreas mais afetadas (Silva et al., 2018; Zanluca et al., 2019).

A febre de chikungunya geralmente consiste em uma doença com sintomatologia dividida em três fases, aguda, subaguda e crônica. A fase aguda é caracterizada principalmente por febre de início súbito e surgimento de intensa poliartralgia, geralmente acompanhada de dores nas costas, cefaleia e fadiga, tendo em média sete dias de duração. A febre durante a fase aguda pode variar entre contínua, intermitente ou bifásica, porém a variação da temperatura não está diretamente ligada a piora dos sintomas. Já a fase subaguda a febre torna-se ausente e inicia-se a persistência ou o agravamento da poliartralgia e surgimento de poliartrite distal, exacerbação de dores articulares em regiões acometidas na fase aguda, além de tenossinovite hipertrófica subaguda em punhos e tornozelos. Nesta fase, é comum o surgimento de prurido generalizado e edemas de intensidade variável. Caso os sintomas persistam até três meses, inicia-se a fase crônica, destaca-se nesta fase a persistência ou recidivante de sintomas articulares e dores na musculatura esquelética. Outros sintomas que podem persistir durante a fase crônica são edemas, limitação de movimento, deformidade e ausência de eritema (Brasil, 2016).

Apesar de não apresentar altas taxas de mortalidade, a disponibilidade limitada de tratamentos para doenças concomitantes (por exemplo, anemia, desnutrição, coinfeções) pode aumentar a taxa de letalidade e os surtos podem sobrecarregar a capacidade da infraestrutura/força de trabalho dos sistemas de saúde (World Health Organization, 2020).

Com a limitação observada no combate à febre chikungunya, nota-se que os desafios enfrentados para o controle do vírus incluem a ausência de uma vacina licenciada e a limitada eficácia de estratégias de controle vetorial, que dependem fortemente da redução da população de mosquitos e da conscientização da comunidade.

O genoma viral pode ser rastreado através da análise do genoma presente nos vetores. Atualmente, todos os estados brasileiros estão infestados por ambos os principais vetores do CHIKV, *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus* gerando preocupação com o estabelecimento de surtos sustentados de CHIKV em todo o país, (Carvalho, Lourenço-de-Oliveira e Braga, 2014; Kraemer *et al.*, 2015). Portanto, a vigilância entomológica é essencial para entender o papel das espécies vetoras na transmissão do CHIKV, especialmente em países tropicais, onde há grande circulação dos vetores transmissores de arboviroses.

Sabe-se que ambas as espécies são vetores competentes para o CHIKV quando infectados em condições de laboratório (Vega-Rúa *et al.*, 2014). Neste sentido, o estudo de Costa-da-Silva e colaboradores coletou mosquitos em casas do município de Aracaju, no estado de Sergipe, e foi o primeiro relato de *Ae. aegypti* naturalmente infectado com o genótipo do vírus ECSA no Brasil (Costa-da-Silva *et al.*, 2017).

De acordo com o Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância da Saúde do Ministério da Saúde, referente às notificações ocorridas entre as semanas epidemiológicas 1 a 44 (2/1/2022 a 5/11/2022), houve aumento de casos nacionais de chikungunya registrados para o mesmo período de 33,0% e 83,3% em comparação com os anos de 2019 e 2021, respectivamente. Para o ano de 2022, a região Nordeste apresentou a maior incidência da doença, que corresponde a 256,2 casos a cada 100 mil habitantes. Alagoas chegou a registrar um aumento de 969% dos casos de chikungunya, de 2 de janeiro até 30 de abril (semana epidemiológica 17 de 2022). Sendo Maceió o segundo município com maior registro de casos prováveis de chikungunya até a semana epidemiológica 44, que corresponde a 5.908 casos (572,7 casos/100 mil hab.) (BRASIL. Ministério da Saúde, 2022).

Registros de anos anteriores fornecem um recorte temporal atualizado da circulação do vírus e das condições epidemiológicas recentes. Portanto, esses dados ajudam a entender padrões de transmissão e avaliar o impacto de medidas de controle adotadas e comparar com anos anteriores para detectar tendências emergentes. Esses fatores estão diretamente ligados à vigilância epidemiológica e molecular do vírus no vetor, uma vez que a identificação do vírus no vetor ajuda a entender melhor a dinâmica de transmissão e a distribuição do vírus em diferentes regiões. As mutações podem afetar a virulência, transmissibilidade e resposta imunológica ao vírus. Algumas variantes podem tornar o vírus mais eficiente na infecção de mosquitos ou humanos, influenciar a gravidade da doença e até impactar a eficácia de vacinas e tratamentos. Monitorar mutações é essencial para prever mudanças na epidemiologia da doença e adaptar estratégias de controle.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. FEBRE CHIKUNGUNYA

Clinicamente, a febre Chikungunya é caracterizada por sintomas que se manifestam em três fases: aguda, subaguda e crônica. Durante a fase aguda, sintomas como dor intensa nas articulações, febre, calafrio, cefaleia, náusea, vômito, fadiga, dor nas costas, mialgia, artralgia simétrica e poliartralgia debilitante são manifestados de dois a seis dias após a infecção pelo vírus (Lima e Nascimento, 2016). Manifestações extra-articulares também podem ocorrer, incluindo erupções cutâneas e sintomas neurológicos. Em casos graves, especialmente em indivíduos com comorbidades como a hipertensão, diabetes, doenças cardíacas e asma, podem elevar os quadros clínicos da infecção, podendo resultar em óbito (de Lima et al, 2021; Castro et al, 2016; Badawi et al, 2018; Córdova-Pluma et al., 2018).

Na fase subaguda, que se estende de 15 a 90 dias após o início dos sintomas, as artralgias podem persistir, e alguns pacientes desenvolvem artrite, com inchaço e rigidez nas articulações afetadas. Já a fase crônica é caracterizada a partir da persistência da poliartralgia durante o período de recuperação, prolongando-se por semanas ou anos (Castro et al, 2016).

Na fase crônica, que pode durar meses ou até anos, pacientes com artrite crônica podem se beneficiar de terapias utilizadas em doenças reumatológicas, como o metotrexato, visando reduzir a inflamação articular e melhorar a qualidade de vida. No entanto, a evidência científica sobre a eficácia dessas intervenções ainda é limitada, e mais estudos são necessários para estabelecer protocolos terapêuticos adequados (Silva et al., 2024).

O tratamento da febre Chikungunya é predominantemente sintomático ou de suporte, uma vez que não há antiviral específico disponível. Na fase aguda, o uso de analgésicos comuns, como paracetamol, é recomendado para o controle da febre e da dor. Anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) devem ser evitados inicialmente devido ao risco de complicações hemorrágicas especialmente em áreas endêmicas de dengue, pois o uso desses AINES em pessoas que estejam infectadas com o vírus da Dengue pode desenvolver essas complicações hemorrágicas. Já na fase subaguda, caso as dores articulares persistam, pode-se considerar o uso cauteloso de AINEs e corticosteroides em doses baixas para alívio dos sintomas, sempre sob supervisão médica (Marques et al., 2017).

2.2 VÍRUS CHIKUNGUNYA

Pertencente ao gênero *Alphavirus* e à família *Togaviridae*, o CHIKV é um vírus de RNA de fita simples, e o vírion do CHIKV é formado por uma cápside icosaédrica composta por 240 cópias da proteína de capsídeo (C), que encapsula o RNA genômico viral (Kuhn, 2013; Voss et al, 2010). Essa cápside está associada a uma camada lipídica derivada da membrana celular do hospedeiro, formando o envelope viral. O envelope contém glicoproteínas E1 e E2, que são fundamentais para a entrada do vírus nas células hospedeiras, facilitando a fusão do envelope viral com a membrana celular e a subsequente infecção (Voss et al, 2010).

A origem do CHIKV está relacionada a vírus ancestrais que circulavam em primatas na África. Um estudo filogenético indicou que a diversidade genômica do CHIKV reflete sua adaptação evolutiva e epidemiológica, especialmente após sua introdução em áreas tropicais e subtropicais fora da África. Modificações genéticas, como a mutação A226V na proteína E1, foram associadas a uma maior capacidade de transmissão pelo mosquito *Aedes albopictus*, contribuindo para a rápida expansão global do vírus em regiões da Ásia e das Américas (Tsetsarkin et al., 2007).

O CHIKV possui aproximadamente 11.800 nucleotídeos, sendo constituído por apenas uma fita simples de RNA de sentido positivo, com um cap na extremidade 5' de 7-metilguanosina e uma cauda poli-A na extremidade 3' (Khan et al, 2002). Esse RNA codifica quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) responsáveis pela replicação viral, e três proteínas estruturais: a proteína de capsídeo (C) e as glicoproteínas de envelope E1 e E2. As proteínas estruturais são essenciais para a formação do virion e a infectividade do vírus (Campos, 2015).

Os alfavírus em geral codificam proteínas estruturais e não estruturais, das quais as lipoproteínas não estruturais são produzidas pela tradução do RNA genômico 49 S que transcreve o RNA subgenômico 26 S através do intermediário de RNA de fita negativa. Após a transcrição do RNA 26 S a poliproteína estrutural é produzida. As proteínas nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 são formados a partir do processamento de lipoproteínas não estruturais (Strauss and Strauss, 1994; Shirako et al., 2000; Tomar et al., 2011).

A análise do genoma viral possibilitou a descrição de diferentes genótipos: Leste-Central-Sul-Africano (ECSA), África Ocidental, asiático e Oceano Índico (Tsetsarkin et al., 2011). A análise de polimorfismos na região E1 também tem sido utilizada para a análise e comparação do genoma viral (Souza et al., 2019; Tanabe et al., 2018). A análise do genoma viral mostrou que a epidemia indiana de 2006 foi causada pelo genótipo ECSA, diferente do

observado na epidemia indiana de 1963 a 1973, que foi causada pelo genótipo asiático (Pialoux et al., 2007).

2.3 HISTÓRICO DO VÍRUS CHIKUNGUNYA

O vírus causador da febre chikungunya, Chikungunya Vírus (CHIKV), foi identificado pela primeira vez em 1952-1953 em Newala, durante um surto na Tanzânia, inicialmente atribuído ao vírus da dengue (Donalisio & Freitas, 2015). Desde então, tem sido responsável por surtos periódicos de febre chikungunya (Silva & Dermody, 2017). Após os surtos identificados na Tanzânia, surtos imprevisíveis com intervalos de 7 a 20 anos foram relatados na África e na Ásia. Entre os anos de 1960 e 1990, novos surtos foram notificados no leste e oeste africano e na África Central (Presti et al, 2014).

Em 1958, CHIKV foi isolado na Tailândia, em Bangkok, porém só em 1960 foi registrado o primeiro surto urbano em Bangkok. Após esse período, as taxas de infecção por CHIKV se elevaram drasticamente por toda a cidade de Bangkok (Nimmannitya et al, 1969; Halstead et al, 1969; Khongwichit et al, 2021). Posteriormente, a Índia registrou os primeiros surtos, em 1963, e rapidamente foi se espalhando por toda África e Ásia, até os anos de 2000, que posteriormente se espalhou para o sudeste Asiático e Oceano Índico (Khongwichit et al, 2021).

Entre 2004 e 2006, uma importante epidemia de CHIKV ocorreu nas ilhas do Oceano Índico, destacando a linhagem Oceano Índico (IOL), uma sublinhagem do genótipo ECSA. Esta epidemia foi amplificada pela adaptação do vírus ao *Ae. albopictus*, vetor predominante em climas temperados, possibilitando surtos em áreas anteriormente não afetadas, incluindo Índia e partes da Europa (Staples et al., 2009). Em 2007, foi relatado o primeiro surto autóctone na Europa, especificamente na Itália, confirmando a expansão de CHIKV para novas fronteiras (Rezza et al., 2006).

No Brasil, os primeiros casos autóctones foram confirmados em 2014, quando duas linhagens genéticas distintas começaram a circular: o genótipo Asiático no Amapá e o ECSA na Bahia. A partir de então, o vírus se espalhou rapidamente pelo país, com a Região Nordeste apresentando os maiores números de casos, como observado entre 2018 e 2022, quando mais de 453 mil infecções foram notificadas na região, com destaque para os estados da Bahia e Ceará (Santos et al., 2024).

O Brasil registrou, até a Semana Epidemiológica 26 de 2024, 233.225 casos prováveis de Chikungunya no País (taxa de incidência de 114,9 casos por 100 mil habitantes) sendo equivalente a 78% dos casos registrados no ano anterior. Aproximadamente 59 casos por 100 mil habitantes foram registrados. Com uma taxa de 0,06% de letalidade, no mesmo período

foram registrados 134 óbitos por Chikungunya, representando um aumento de 42,5% quando comparado com o ano anterior (Brasil, 2024).

2.4 EPIDEMIOLOGIA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA

Após sua identificação inicial, o CHIKV permaneceu restrito a áreas específicas da África e da Ásia, com surtos esporádicos. No entanto, a partir de 2004, o vírus começou a se espalhar para novas regiões, causando epidemias em escala global (Silva & Dermody, 2017). Em 2013, foi introduzido nas Américas, com os primeiros casos autóctones registrados na Ilha de São Martinho, no Caribe (OMS, 2023).

O genótipo ECSA foi descrito em casos autóctones no Rio de Janeiro (Cunha et al., 2017; Souza et al., 2017). Enquanto casos importados de genótipo asiático também têm sido descritos no Sudeste do Brasil (Conteville et al., 2016). O estudo de Souza et al (2019), analisou o genoma viral em amostras de plasma ou soro de 1835 pacientes com suspeita de Chikungunya entre os anos de 2016 e 2017 no Rio de Janeiro. A análise filogenética indicou que todas as sequências brasileiras do Rio de Janeiro pertenciam ao genótipo ECSA, apresentando baixa diversidade genômica. No entanto, a análise de 14 sequenciamentos mostrou uma forte correlação entre a divergência genética e a data em que a amostra foi coletada.

Utilizando uma ferramenta conhecida como “relógio molecular”, que permite relacionar o tempo de divergência entre duas linhagens atuais com o número de diferenças moleculares entre elas, os autores sugerem que o genótipo ECSA foi provavelmente introduzido em um único evento no Brasil em 2013, até um ano antes das estimativas anteriores (Souza et al., 2019). Além disso, através da análise filogenética temporal, os autores sugerem que após a entrada no estado da Bahia, o genótipo ECSA se espalhou para outros estados do Nordeste (Alagoas e Paraíba) e para o Rio de Janeiro (região Sudeste) e que, a partir do Rio de Janeiro, essa linhagem retornou à região Nordeste, espalhando-se para Sergipe (Souza et al., 2019).

A análise da disseminação do vírus chikungunya (CHIKV) revela que os primeiros casos autóctones foram registrados em 2015 em Pernambuco, Brasil, com o estado alternando entre períodos de endemia e epidemia desde então (Santos et al., 2023).

Em 2017, um estudo destacou que a disseminação do CHIKV está associada à presença de mosquitos vetores como *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, intensificada por fatores como urbanização desordenada, mudanças climáticas e aumento da mobilidade humana (Silva & Dermody, 2017). Entre 2018 e 2022, o Nordeste brasileiro notificou mais de 453 mil casos, com Bahia e Ceará liderando em notificações (23% e 22%, respectivamente), enquanto o Rio Grande do Norte apresentou a maior taxa de incidência (24,2 casos/100 mil habitantes) (Santos et al., 2024).

Já em 2023, o vírus expandiu-se para a Região Sudeste do Brasil, anteriormente concentrada no Nordeste (BRASIL, 2024). No início de 2024, foram registrados 14.958 casos prováveis no Brasil nas semanas epidemiológicas 1 a 4, com maior incidência nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Norte, enquanto os maiores óbitos se concentraram no Nordeste (SAÚDE, 2024). Até 30 de novembro de 2024, 480.000 casos e mais de 200 mortes foram relatados mundialmente, com maior impacto no Brasil, Paraguai, Argentina e Bolívia, e a presença do CHIKV registrada em 23 países (ECDC, 2024). A capacidade do vírus de estabelecer ciclos de transmissão urbana e a influência de fatores climáticos reforçam o risco de epidemias futuras (Araújo et al., 2024).

2.5 VETORES

O vírus da febre Chikungunya é transmitido principalmente pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, espécies reconhecidas por seu papel como vetores na transmissão de diversas arboviroses, incluindo o vírus da dengue e o Zika vírus. Esses mosquitos possuem uma alta adaptação ao ambiente urbano, onde depositam seus ovos em recipientes com água parada, como pneus, latas e vasos de plantas. A transmissão do CHIKV ocorre quando o mosquito se infecta ao picar uma pessoa infectada e, após um período de incubação no mosquito, o vírus é transmitido para humanos por meio da picada subsequente (Pereira et al., 2015).

O *Ae. aegypti* é o vetor mais associado à transmissão de CHIKV nas áreas urbanas, sendo o responsável pela disseminação do vírus em várias regiões tropicais e subtropicais, especialmente na América Latina e Caribe. O *Ae. albopictus*, embora mais comumente encontrado em áreas rurais e suburbanas, também tem desempenhado um papel importante na transmissão do CHIKV, especialmente em regiões onde a densidade do *Ae. aegypti* é menor (Fonseca et al., 2019; Maciel et al., 2020).

O ciclo de vida do *Ae. aegypti* pode variar conforme as condições ambientais, mas, em média, o mosquito passa por quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adultos. O tempo total de vida do mosquito, desde o ovo até a fase adulta, geralmente dura entre 7 a 10 dias em condições ideais de temperatura e umidade. Fatores climáticos, como temperatura elevada e chuvas, favorecem a reprodução e a proliferação dos mosquitos, uma vez que o *Aedes* prefere ambientes urbanos e áreas de água parada para depositar seus ovos, como recipientes de lixo, pneus e depósitos de água (Rezza et al., 2006).

Após emergirem dos ovos, os mosquitos podem voar brevemente, porém é necessário um repouso de até 48 horas para que seu exoesqueleto e asas endureçam antes do voo para que seja mais eficiente. Além disso, os machos necessitam do endurecimento dos pelos fibrilares das antenas para que possam localizar as fêmeas, essa ereção ocorre em 15 e 24 horas após a emergência (Clements, 1963; Nelson, 1986; Facchinelli, 2023). De acordo com Gwadz et al (1971), as fêmeas de *Ae. aegypti* não são inseminadas até 48 após emergir. No entanto, após 2 ou 5 horas de seu surgimento, elas tornam-se atrativas para os machos, podendo assim haver copulação, ainda que sem inseminação (Gwadz et al, 1968; Lea, 1968).

As fêmeas de *Ae. aegypti*, possuem um comportamento hematófago incessável, sendo atraída pelo hospedeiro a partir da temperatura corporal e pelo dióxido de carbono liberado pela pele do hospedeiro (McMeniman et al, 2014; Strauss et al, 1966). Ao decorrer do tempo, as

fêmeas de *Ae. aegypti* desenvolveram comportamentos endofílicos, onde preferem esperar por hospedeiros ao invés de caçá-los. Esse comportamento foi observado em populações de mosquitos domésticos e selvagens após uma observação comportamental do *Aedes aegypti* durante um surto de dengue em Ouagadougou, Burkina Faso, nesse estudo os pesquisadores observaram que os mosquitos domésticos possuíam o comportamento de “sentar e esperar” quando os mosquitos selvagens iam buscar suas presas (Badolo et al, 2022).

Como as fêmeas de *Ae. aegypti* necessitam de grandes quantidades energéticas para a oviposição, as fêmeas se alimentam de sangue em grande quantidade após o acasalamento para o desenvolvimento dos ovos. Esse comportamento pode ocorrer duas vezes com o repasto sanguíneo até a oviposição (Klowden et al, 1978; Brown et al, 1994). Após a alimentação, as fêmeas necessitam repousar até o desenvolvimento dos ovos, buscando um local isolado e com condições ambientais propícias para o seu descanso e oviposição (Howard, 1923). Áreas com sombras e superfícies escuras não reflexivas e próximas à fontes de água são preferenciais para as fêmeas, para a deposição dos ovos (Tainchum et al, 2013; Schoof, 1967; Clark e Suarez, 1991). Essa preferência por superfícies escuras pode ser analisada no estudo realizado por Ouédraogo et al (2022), que observou a preferência considerável por repousar/ovipositar em pneus ao invés de outros recipientes como bebedouro de animais e pequenos recipientes contendo água.

Dado o desenvolvimento e comportamento do vetor, os surtos de doenças transmitidas por esses vetores para hospedeiros dependem de fatores intrínsecos como a capacidade genética de portabilidade e desenvolvimento do vírus e extrínsecos como os fatores ambientais propiciam um ambiente adequado para a sobrevivência e disseminação do vírus (Kramer e Ciota, 2015).

Portanto, quando uma fêmea de *Aedes* se alimenta do sangue de um hospedeiro infectado, o vírus é ingerido junto com a refeição sanguínea. Inicialmente após a infecção pelo vírus, adquirida através de um hospedeiro infectado, o vírus necessita ultrapassar algumas barreiras biológicas para que enfim consiga se replicar no vetor. O ciclo de replicação inicia-se ao ultrapassar microbiota intestinal para se desenvolver nos tecidos do intestino médio. Após o desenvolvimento do vírus no intestino médio, o vírus infecta tecidos adjacentes, como as gônadas e os tecidos das glândulas salivares (Lounibus e Kramer, 2016). Esse processo, conhecido como disseminação sistêmica, depende da capacidade do CHIKV de evadir respostas antivirais do inseto, como a via do RNAi (RNA interferente), que normalmente atuaria como um sistema de defesa (Mathur et al, 2016).

O Estudo de Tsetsarkin et al, (2007), publicado na PLoS Pathogens, destacam que mutações específicas no genoma viral, como a substituição E1-A226V, aumentam a adaptação do CHIKV ao *Ae. albopictus*, permitindo que o vírus se replique mais eficientemente nesse vetor. Essa adaptação é um exemplo notável de como mudanças genéticas podem ter grandes impactos epidemiológicos, especialmente em regiões onde esse mosquito é predominante. Um outro estudo realizado por Weaver et al, (2016), explica que a interação entre proteínas virais e componentes celulares do vetor como a proteína de capa do vírus e receptores mosquitos é crucial para garantir a sobrevivência do CHIKV, o que permite a entrada do vírus no vetor de forma silenciosa e eficaz.

A etapa final da replicação do vírus no vetor ocorre quando o CHIKV se acumula nas glândulas salivares do mosquito, pronto para ser injetado em um novo hospedeiro durante a próxima picada (Veja-Rúa et al, 2015). Curiosamente, o estudo de Coffey et al. (2008), revela que a eficiência dessa transmissão não depende apenas da carga viral, mas também da resposta imunológica local do vetor. Alguns mosquitos, por exemplo, produzem moléculas antivirais em suas glândulas salivares que podem limitar a disseminação, embora o CHIKV frequentemente consiga contornar essas defesas. Esse processo imunológico e molecular entre vírus e vetor ajuda a explicar por que certas linhagens de CHIKV se tornam dominantes em surtos, enquanto outras desaparecem, como podemos ver a predominância de determinados genótipos circulantes em diferentes locais do mundo.

Fatores ambientais, como a temperatura, também influenciam nesse desenvolvimento. Um estudo de Dubrulle et al. (2009), no American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, mostra que temperaturas mais elevadas aceleram o ciclo de replicação do CHIKV no mosquito, encurtando o período de incubação extrínseco. A eficiência de transmissão é maior em temperaturas mais altas, o que facilita a disseminação do vírus durante períodos de clima quente e úmido. A relação entre a dinâmica populacional dos mosquitos e a circulação do vírus é também determinada pela taxa de infecção dos mosquitos e pelo comportamento das fêmeas que buscam sangue para a produção de ovos (Zanluca et al., 2019). Isso significa que, em um mundo cada vez mais quente, os mosquitos podem transmitir o vírus mais rapidamente após a infecção, ampliando o risco de epidemias.

Apenas as fêmeas são responsáveis pela transmissão do vírus, já que são as fêmeas que se alimentam de sangue, essencial para o desenvolvimento de seus ovos. Os machos, por sua vez, se alimentam exclusivamente de néctar e não têm contato com o sangue humano, não participando da transmissão do vírus (Lambrechts et al., 2010). Além disso, há evidências de que o vírus pode ser transmitido de uma geração de mosquitos para outra, ou seja, transferência

vertical do CHIKV. Isso ocorre quando a fêmea infectada transmite o vírus para seus ovos, que, ao eclodirem, produzem larvas infectadas. A transferência vertical tem sido observada como um fator de risco significativo para a perpetuação do vírus nas populações de mosquitos, principalmente em áreas com alta carga de casos (Mourya et al., 2016).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através desse estudo foi possível identificar a grande importância do estudo do vírus em vetores, uma vez que o estudo do vetor permite a compreensão da dinâmica epidemiológica dessa doença. Os resultados obtidos demonstraram que a vigilância epidemiológica deve ser intensificada, com foco no monitoramento das populações de mosquitos e nas análises moleculares do vírus CHIKV. A identificação de genótipos do vírus pode fornecer informações valiosas sobre a evolução do patógeno e suas implicações para a saúde pública.

Além disso, é fundamental que as políticas de controle de vetores sejam aprimoradas, integrando estratégias de educação em saúde, mobilização comunitária e uso de tecnologias inovadoras. A colaboração entre instituições de pesquisa, órgãos de saúde e a comunidade é essencial para o sucesso das ações de prevenção e controle da febre Chikungunya.

Por fim, este trabalho ressalta a necessidade de mais estudos sobre a interação entre o vírus, os vetores e o ambiente, visando não apenas a compreensão da epidemiologia da doença, mas também a implementação de medidas eficazes para a proteção da saúde da população.

4. ARTIGO CIENTÍFICO ORIUNDO DA DISSERTAÇÃO

Morphological identification of *Aedes aegypti* and first detection of a naturally infected vector with the Chikungunya virus in the state of Alagoas, Brazil.

Abstract

The increasing incidence of mosquito-borne diseases, such as dengue and chikungunya fever, has become a significant public health concern in several regions of Brazil, especially in urban and peri-urban areas. This study aimed to detect the presence of Chikungunya virus (CHIKV) in *Aedes aegypti* mosquitoes in the state of Alagoas, Brazil, and to compare the similarity of the viral genome in different hosts, including mosquitoes and humans, through phylogenetic analyses. Collections were performed at specific morning times using a vacuum aspirator, and mosquitoes were identified based on morphological characteristics of adult specimens. RNA extraction was performed on individual females and pools of males of *Ae. aegypti*, followed by detection of CHIKV via RT-qPCR. For phylogenetic analysis, 25 CHIKV sequences isolated from *Aedes aegypti* from its first isolation until 2024, in four Brazilian states, were investigated and aligned with 569 human sequences from the same states and periods. A total of 1,052 mosquitoes were collected, of which 477 were identified as *Ae. aegypti*, 51.15% females. The results indicated that four females and one pool of males tested positive for CHIKV, while all samples tested negative for the four dengue virus serotypes. Phylogenetic analysis revealed that viral sequences from human samples and vectors clustered with sequences from the same years, suggesting different transmission dynamics. This study provides the first evidence of CHIKV circulation in mosquitoes in the state of Alagoas, reinforcing the importance of molecular surveillance of the virus in vectors to better understand its transmission dynamics.

Keywords: Arboviruses, CHIKV, Mosquito-borne disease.

Introduction

Between March 2013 and June 2022, a total of 253,545 chikungunya cases were confirmed in Brazil across more than 5,000 cities in all states, with the northeast region being the most affected, reporting over 160,000 laboratory-confirmed cases (160,909/253,545) (de Souza et al., 2023). In Alagoas, the number of chikungunya cases increased significantly from

41.5 to 514.8 cases per 100,000 inhabitants between 2015 and 2016, reflecting an 8.06% rise (Ministério da Saúde, 2016).

The fever chikungunya disease is caused by an RNA virus belonging to the *Togaviridae* family and the *Alphavirus* genus, known as Chikungunya virus (CHIKV). The disease typically presents with acute symptoms, including fever, skin rash, and severe joint pain (arthralgia), as well as headaches and ocular pain (Brazil, 2016). Although the disease does not have a high mortality rate, limited access to treatments for coexisting conditions (e.g., anemia, malnutrition, coinfections) can increase case fatality rates. Additionally, outbreaks may overwhelm the healthcare system's infrastructure and workforce capacity (World Health Organization, 2024). Chikungunya is an infectious disease transmitted by a culicine mosquito of the genus *Aedes*, which is frequently referred in the literature as *Stegomyia* due to some phylogenetic debate (HARBACH, 2007).

Since 2004, the chikungunya virus has spread to other regions of the world, and has been identified in more than 60 countries across Asia, Africa, Europe, and the Americas (World Health Organization, 2024). The first case of autochthonous transmission in the Americas was reported on the Caribbean island of Saint Martin in 2013, where the Asian genotype was identified. After the virus was introduced to the region, approximately 600,000 suspected cases were reported, approximately 4,356 cases were laboratory-confirmed and 37 deaths occurred due to chikungunya disease (Leparc-Goffart et al., 2014; Vasconcelos, 2014). Since 2014, both the Asian and East/Central/South African (ECSA) genotypes have circulated in Brazil's northern (Amapá) and northeastern (Bahia) regions, respectively (Nunes et al., 2015; Teixeira et al., 2015). The ECSA genotype has subsequently been detected in other states, particularly in Sergipe (Costa-da-Silva et al., 2017) and Rio de Janeiro (Souza et al., 2017), in the northeast and southeast regions, respectively.

The circulation of multiple genotypes increases the potential for co-infections and genetic recombination (Machado et al., 2019). In Brazil, the Asia genotype was the unique detected, if not, the most prevalent until 2015. After which the ECSA genotype, which is better adapted to the environment, has remained in circulation (Souza et al., 2019; de Souza et al., 2024). Continuous surveillance of the virus in high-risk areas with endemic mosquitoes, combined with genomic data, can offer timely insights to guide effective public health responses. Furthermore, more studies are needed to understand the role of mutations in mosquito adaptability, viral replication, and chikungunya pathogenesis (Cunha et al., 2020).

Given the high number of arbovirus cases recorded across Brazil and the historical global circulation of these diseases, the need for in-depth studies on the dynamics of arboviruses

and their arthropod mosquitoes is evident. Mosquitoes such as *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* are of critical importance to global public health because of their rapid reproductive cycles, swift dissemination, and remarkable vector capacities. Therefore, viral identification is essential, as the virus reproductive cycle occurs within mosquitoes and hosts through both intrinsic and extrinsic factors (Lounibos and Kramer, 2016). Furthermore, all federative units worldwide, including Brazil, must intensify the epidemiological surveillance of mosquitoes and arboviruses. The aims of this study were investigate the evaluate the presence of chikungunya virus (CHIKV) in *Aedes aegypti* mosquitoes in the state of Alagoas, Brazil, and to assess the similarity among the virus genome in different hosts, mosquitoes and humans, using phylogenetic analyses.

Materials and Methods

Study Area and Mosquito Collection. Vector collection was carried out in regions with recent cases of chikungunya disease. Four cities in the state of Alagoas, Brazil, were selected for collections, including Maceió (9°39'57"S 35°44'06"W), Maragogi (9°00'44"S 35°13'21"W), União dos Palmares (09°09'46"S 36°01'55"W) and Viçosa (20°45'14"S 42°52'55") (**Figure 1**). In Maceió, collection sites were selected based on the 2022 Rapid Index Survey for *A. aegypti* (LIRAA) of 2022, using epidemiological data from the first and third epidemiological cycles (weeks 1 to 38) to identify high-risk areas. A total of 15 neighborhoods were included: Barro Duro, Bom Parto, Chã da Jaqueira, Garça Torta, Gruta de Lourdes, Jaraguá, Jardim Petrópolis, Jatiúca, Pinheiro, Pitanguinha, Poço, Ponta Verde, Prado, Santo Amaro, and São Jorge. In Maragogi, União dos Palmares and Viçosa, mosquito collection was conducted by teams of endemic disease control agents in predefined areas based on cases reported by the Central Laboratory of Alagoas (LACEN/AL). Collections were carried out in residential, peridomestic, and building sites between 8:00 AM and 11:00 AM using a vacuum aspirator (Horst Armadilhas, São Paulo/SP) (Costa-da-Silva et al., 2017), from January to June 2024, with two collections in the Barro Duro, Gruta de Lourdes and Ponta Verde neighborhoods and only one collection in the other neighborhood.

Mosquitoes Identification. At the end of the collections, the mosquitoes were kept alive and transported in thermal boxes containing ice to the Virology and Immunology Research Laboratory (LAPEVI) of the Federal University of Alagoas, where they were anesthetized with ice. The mosquitoes were then placed on glass plates and identified using binocular

stereomicroscopes and the entomological key for the main species of public health importance in Brazil (Consoli and Oliveira, 1994). To differentiate the two species of interest in the study, all mosquitoes with a black body and white-striped legs, characteristic of mosquitoes from the *Aedes* genus, were screened. *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* were retained for the study, while mosquitoes from other species were discarded. After selecting the mosquitoes of interest, *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* were identified and separated based on morphological patterns. In *Ae. aegypti*, silver-white and black scales were identified on the scutellum in a lyre shape (the convex dorsal region of the thorax) (**Figure 2E**), a silver-colored clypeus (**Figure 2A**), and a light band on the anterior face of the femur of the middle leg (**Figure 2B**), as well as two separate scales on the mesoepimeron (**Figure 2D**) and serrated tarsal claws on the foreleg of the female (**Figure 2C**). For *Ae. albopictus*, identification was based on the longitudinal band on the convex dorsal region of the thorax, the absence of both the silver-colored clypeus and the light band on the femur, and the presence of joined scales on the mesoepimeron, according to the entomological key (Consoli and Oliveira, 1994). Additionally, the number of males and females was quantified. The mosquitoes were stored in a freezer at -20°C until RNA extraction.

RNA Extraction and CHIKV/DENV Detection by RT-qPCR in Mosquitoes. For total RNA extraction, samples of individual female mosquitoes were prepared from the head, thorax, and abdomen, as well as pools of 5 whole males. Each sample was first macerated with 200 µL of 1x PBS and 5 µL of Proteinase K (K204-2, Bioclin, MG, Brazil). To serve as an internal extraction control, 10 µL of the RP-V IC 2 from Seegene kit (Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay, MG, Brazil) was added. This internal control consists of an exogenous molecule whose nature is not specified by the manufacturer. It serves to monitor the efficiency of RNA extraction, amplification and possible inhibition during the RT-PCR process. The internal control was amplified according to the manufacturer's instructions (Allplex™) after all extractions to confirm extraction efficiency. The sample was stored at -80°C until RNA extraction. The extraction was performed automatically using the Extracta® 96 DNA and RNA extractor and purifier, with the Extracta Kit – DNA and RNA from Pathogens (Loccus, São Paulo, Brazil), following the manufacturer's recommendations. The samples underwent molecular analysis for the detection of Dengue virus serotypes (DENV 1/4 and DENV 2/3) and CHIKV, using a multiplex kit (IBMP Biomol ZDC, Paraná, Brazil). The detection of DENV serotypes aimed to verify whether the mosquitoes carried more than one virus or only CHIKV. The samples were processed in a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System of BioRad (BioRad, SP) with One Step qRT-PCR multiplex conditions. The total volume and cycles for

DENV and CHIKV were as follows: 9.5 µL of total RNA in triplicate, 6.66 µL of dNTPs, 2.0 µL of primers, 1.0 µL of probe, 0.5 µL of RT enzyme, and 0.34 µL of RNase-free water per sample. The thermocycler conditions were set for an initial incubation at 51 °C for 30 min, followed by 95°C for 15 min, and 40 cycles at 95°C for 15 sec and 60 °C for 1 min. For each target of interest, a positive control consisting of specific viral RNA (DENV 1/3, DENV 2/4, and CHIKV) was added. Cycle threshold (CT) values below 36 were considered positive, CT values equal to or greater than 36 were classified as indeterminate, and the absence of amplification was considered negative, following the protocol of the kit used. The negative control consisted of RNase-free water.

Phylogenetic Analysis. To conduct phylogenetic analysis among the circulating genotypes in mosquitoes and humans, a collection of CHIKV sequences from humans and mosquitoes was generated, both with more than 10,000 base pairs and high sequencing coverage on the GISAID database, and all sequences obtained in this analysis were of the ECSA genotype. 25 vector sequences were collected in GISAID from four Brazilian states between the years 2016 to 2024. Were obtained mosquito sequences, Minas Gerais, Pará, São Paulo and Sergipe were aligned using Aliview. To assess the phylogenetic relationships of the CHIKV genomes, the sequences were realigned together with 569 human sequences from the same states as the sequences obtained from vectors between the same years from GISAID. After alignment, a representative sequence from each state was selected to construct the phylogenetic tree. The selected sequences were aligned using MAFFT (Katoh and Standley, 2013) using the Unipro UGENE software (Okonechnikov et al., 2012). The alignment was subsequently refined in the Aliview program (Larsson, 2014), ensuring the uniformity of the sequence lengths. The final alignment file was processed in MEGA version 11 (Tamura et al., 2021), where the phylogenetic analyses were conducted. The phylogenetic tree was built using the Neighbor Joining method (Saitou and Nei, 1987), and its reliability was assessed using the bootstrap analysis (Felsenstein, 1985) with 1000 replicates. The substitution model used was Maximum Composite Likelihood (Tamura et al., 2004).

Statistical Analysis. The statistical analysis of the vector population data statistical analysis was conducted using GraphPad Prism Version version 8 (GraphPad Software for Windows, Inc., San Diego, CA, USA). Chi-square test was used to analyze the relative abundance between cities. A significance level of 5% ($P < 0.05$) was adopted to determine the statistical significance of the results.

Results

Epidemiology of *Ae. aegypti* in Alagoas

Our results showed that *Ae. aegypti* accounted for 477 (45.35%) out of 1052 collected specimens across the four cities analyzed, with 244 (51.15%) being *Ae. aegypti* females (**Table 1**). Among the cities evaluated in this study, during the first collection in all cities, Maceió presented a significantly higher percentage of *Ae. aegypti* (**Figure 4**).

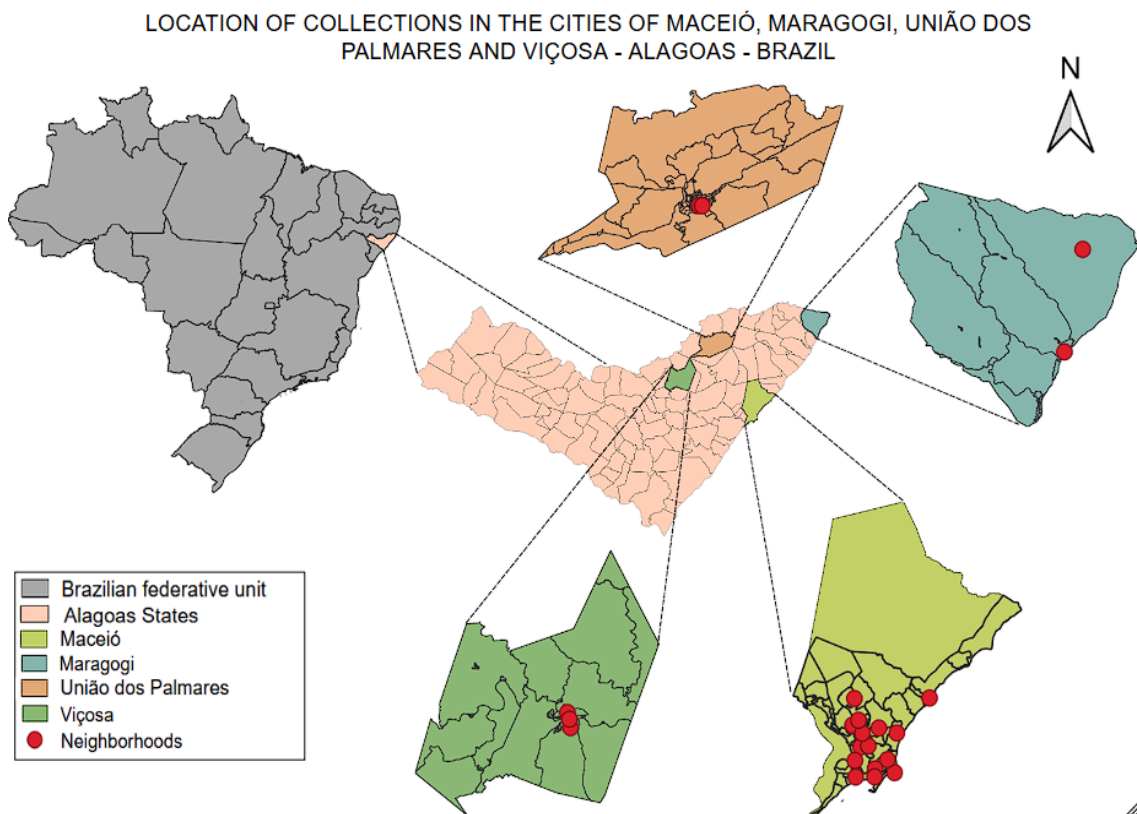


Figure 1. Vector collection location in the Alagoas state. Mosquitoes collections were conducted in four cities in areas with a high level of detection of *Ae. aegypti* and cases of chikungunya fever and dengue fever according to the city health departments, including Maceió, Maragogi, União dos Palmares, and Viçosa. The red markers indicated the neighborhoods visited in each city. These areas were selected based on recent records of chikungunya cases reported by the health departments of each municipality.

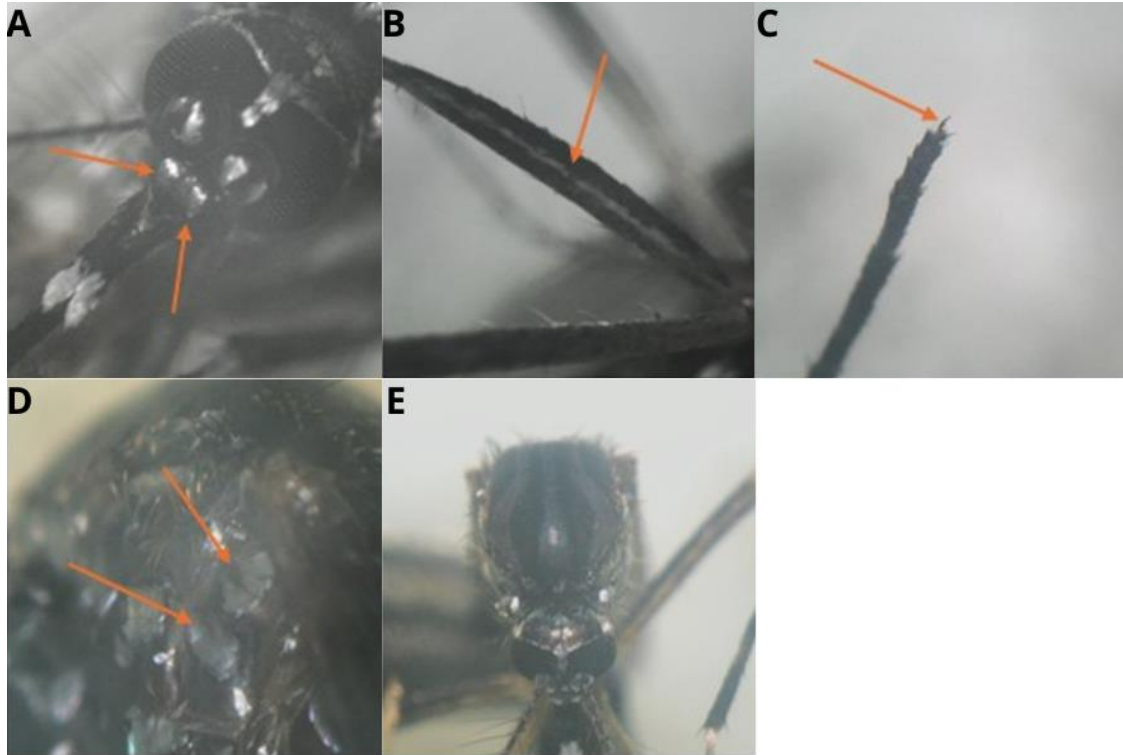


Figure 2. Morphological characteristics of the *Aedes aegypti* species used for entomological identification after collections. A) Clypeus with two silvery tufts on the head; B) light band on the anterior face of the femur of the middle leg; C) Serrated tarsal claws on the foreleg of the female; D) Mesoepimeron with two separate silvery escapes; E) Median-longitudinal white stripe lyre-shaped thoracic pattern scales.

Table 1. Viral sample positivity and the abundance of *Ae. aegypti* captured across multiple Alagoas cities.

Cities	Collecti on Period	Neighborhoods	Total mosquitoes collected	Total of <i>Ae. aegypti</i> collected	<i>Ae. aegypti</i>		RT-qPCR					
					Male	Female	CHIKV		DENV 1/4		DENV 2/3	
							Pool	Femal e	Pool	Femal e	Pool	Female
Maceió	January to March 2024	Barro Duro	33	32	18	14	0	0	0	0	0	0
		Chã da Jaqueira	19	19	7	12	0	0	0	0	0	0
		Clima Bom	4	4	1	3	0	0	0	0	0	0
		Garça Torta	34	13	9	4	0	0	0	0	0	0
		Gruta de Lourdes	24	24	14	10	0	0	0	0	0	0
		Jaraguá	74	22	7	15	0	0	0	0	0	0
		Jardim Petrópolis	12	9	5	4	0	0	0	0	0	0
		Jatiúca	16	8	4	4	0	0	0	0	0	0
		Pinheiro	59	12	5	7	0	0	0	0	0	0
		Pitanguinha	13	6	2	4	0	0	0	0	0	0
		Poço	59	49	21	28	0	0	0	0	0	0
		Ponta Verde	77	48	22	26	0	0	0	0	0	0
		Prado	50	37	16	21	0	0	0	0	0	0
		Santo Amaro	38	15	1	14	0	0	0	0	0	0
		São Jorge	76	14	4	10	0	0	0	0	0	0
	July 2024	Barro Duro	129	25	4	21	0	0	0	0	0	0
		Ponta Verde	114	111	88	23	1	4	0	0	0	0
		Gruta de Lourdes	43	13	2	11	0	0	0	0	0	0
União dos Palmares	January 2024	Roberto Correia de Araújo	56	4	1	3	0	0	0	0	0	0
Viçosa	July 2024	Santa Ana	50	12	2	10	0	0	0	0	0	0
Maragogi			72	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		TOTAL	1052	477	233	244	0	0	0	0	1	4

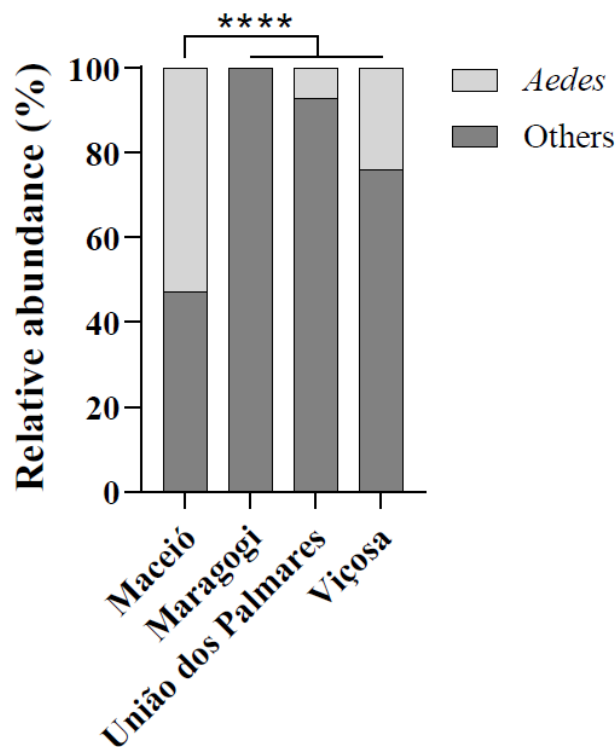


Figure 3. Relative abundance of mosquitoes among sampled cities. Relative abundance (%) of *Ae. aegypti* and other mosquitoes collected in Maceió, Maragogi, União dos Palmares and Viçosa. **** represent $p < 0.0001$ comparing Maceio vs other cities.

In Maceio, the highest vector abundance was observed in the Barro Duro, Poço, and Ponta Verde neighborhoods (**Figure 4A**), while 100% of the mosquitoes captured in the Chã da Jaqueira, Clima Bom, and Gruta de Lourdes neighborhoods were identified as *Ae. aegypti* (**Figure 4B**).

During the collection, a shift in the abundance of both *Ae. aegypti* and other mosquitoes collected was observed in three neighborhoods of Maceió: Barro Duro, Gruta de Lourdes and Ponta Verde across two periods with different climatic conditions (**Table 1**, **Table 2** and **Figure 4A**). The first collection, conducted between January and March during a hot and dry period, recorded 134 mosquitoes. In contrast, the second collection, conducted in July during a hot and rainy period, recorded 286 mosquitoes, representing an increase of 118.32% in mosquitoes abundance within the same area, the second collection was carried out using data from positive cases of chikungunya fever provided by LACEN-AL.

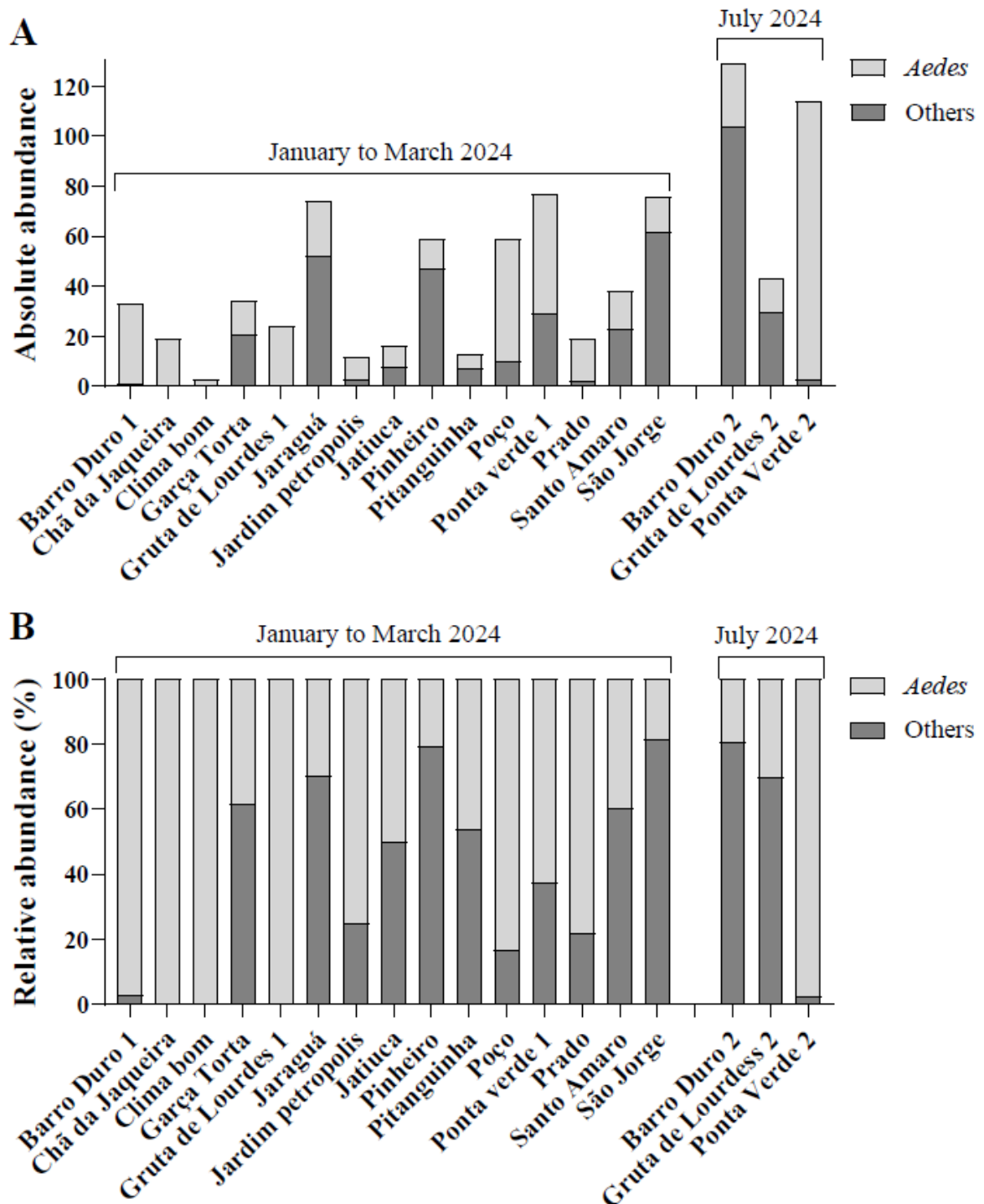


Figure 4. Abundance of *Aedes* in Maceió, Alagoas, Brazil. Absolute (A) and relative (B) abundance of *Aedes* and other mosquitoes that are of other genus and not *Aedes* genus in 15 endemic neighborhoods of Maceió, distributed in two periods: January to March 2024 and July 2024.

Table 2. Climatic conditions of the collection months carried out in the Maceió city - AL.

City	Collection month 2024	Average Precipitation (mm)	Average Temperature (°C)	Average relative air humidity (%)
Maceió	January	0	30,9	63,30
	February	1,18	30,3	74,19
	March	0	31,3	69,10
	July	0,85	26,6	86,08

Detection of CHIKV and DENV in mosquitoes

A total of 327 samples were analyzed for DENV 1/4, DENV 2/3, and CHIKV, comprising 244 samples from individual females, including head, thorax, and abdomen, and 83 samples from male pools. Among all the analyzed samples, four individual female samples and one male pool tested positive for CHIKV, with Cycle threshold (Ct) values ranging from 30 to 35. All positive samples were collected in the Ponta Verde neighborhood, which is located in Maceió.

In parallel with CHIKV detection, the four serotypes of DENV were also tested to determine whether the mosquitoes were carriers of multiple viruses or only CHIKV. All tested samples returned negative results for DENV serotypes.

Phylogenetic analysis

From the GISAID database, 25 CHIKV sequences found in infected *Aedes* mosquitoes from four Brazilian states between 2016 and 2024 and 569 sequences derived from humans infected with CHIKV from the same states as the vector sequences were selected. The collected data allowed the construction of a phylogenetic tree (**Figure 5**).

Genetic sequences derived from vector samples formed clades alongside sequences obtained from humans from the same states. Furthermore, significant genomic affinity was observed in samples circulating in the same region of the country as vector samples from the same or close years, as observed in a vector sample from Pará (2017) and Sergipe (2016), where this sequence clustered with human sequences from 2017 and 2018 from the same location. Furthermore, sequences from São Paulo and Minas Gerais clustered with human sequences

from 2024 and 2023, indicating that transmission may be occurring in a sustained manner in the region.

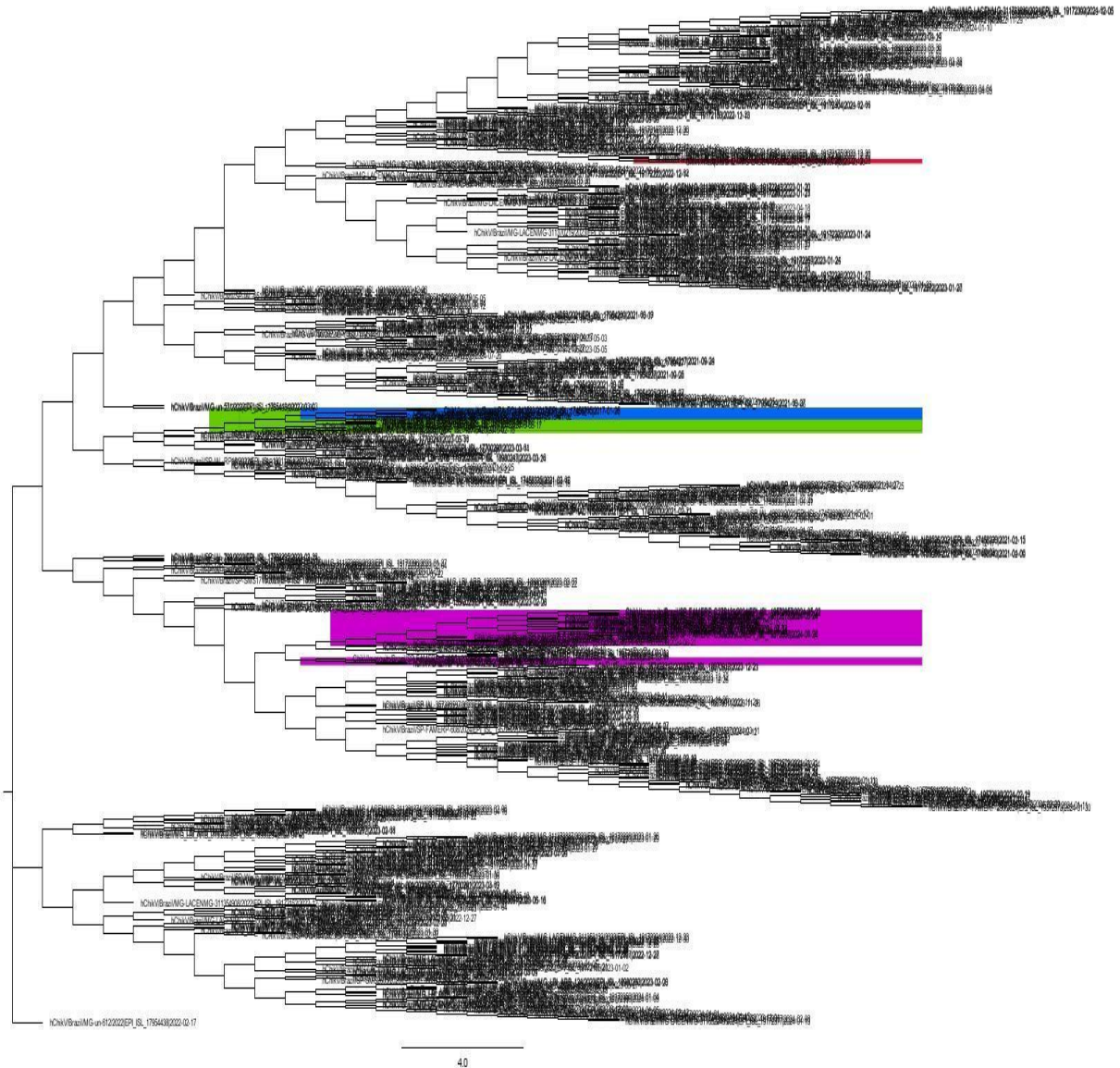


Figure 5. The phylogenetic tree presented was constructed using the Neighbor Joining method to infer the evolutionary relationships among the viral sequences. The reliability of the groupings was assessed through a bootstrap analysis with 1000 replicates. The prefix “h” represents the sequences extracted from humans. The colors represent vector genomic sequences. The red color represents sequences from Minas Gerais in 2022. The blue color represents sequences from Pará in 2017. The green color represents sequences from Sergipe in 2016 and the purple color represents sequences from São Paulo in 2024..

Discussion

The present study aimed to detect Chikungunya virus (CHIKV) in mosquitoes and this study is the first to identify the presence of the CHIKV in mosquitoes from the state of Alagoas,

Brazil. The mosquitoes were identified using an entomological key (Consoli and Oliveira, 1994), which is essential for ensuring traceability, organization, and interpretation of the data obtained. The use of entomological keys has often been neglected in many studies, leading to difficulties in replicating results and even interpretative errors. Therefore, the use of identification keys strengthens the methodological quality in the handling of mosquitoes and guarantees the correct identification of the vector species.

Among the locations evaluated in our study, Maceió had the highest abundance of *Aedes* among the total of mosquitoes collected. In addition, a change in the absolute abundance of these mosquitoes was observed in three neighborhoods of Maceió, comparing collections made during a hot and dry period with those made during a hot and rainy period, **Table 2**. A study conducted in 2016 in the state of Alagoas reported human-positive CHIKV samples during the rainy periods, with the peak number of positive samples in May, suggesting the greater proliferation of disease-transmitting mosquitoes (Tanabe et al., 2018). Climatic conditions can influence the reproductive rate of mosquitoes, as favorable environments with high temperatures, humidity, and rainfall are essential for mosquito reproduction (Martin et al., 2021). Rainfall precipitation is a critical factor for the reproduction of mosquitoes, as plastics and other improperly discarded containers collect water, providing an ideal environment for insect breeding (Morrison et al., 2004).

Aedes aegypti mosquitoes are recognized vector for arboviruses such as Dengue, Zika, and Chikungunya, which have been identified in various regions of Brazil (Aragão et al., 2018; Costa-da-Silva et al., 2017). However, studies on the molecular epidemiology of CHIKV have focused mostly on human blood samples. A literature review identified 12 studies that performed genome sequencing of viral samples from mosquitoes, with only two in Brazil (Aragão et al., 2019; Aukornkitti et al., 2010; Carrasquilla et al., 2021; Hapuarachchi et al., 2021; Intayot et al., 2021; Le et al., 2020; Nanakorn et al., 2021; Phumee et al., 2021; Ribeiro Cruz et al., 2020; Selhorst et al., 2020; White et al., 2018). These studies used different strategies to detect CHIKV in mosquitoes, using individualized females and male pools, as we did, and others using female or male pools. All studies detected a low percentage of infected mosquitoes when compared to the amount collected, with less than 4% of pools of infected females tested for CHIKV and DENV in each study. When we compare the studies that detected individual females for CHIKV, it is possible to observe the low number of infected mosquitoes found, as well as ours. The detection of infected males only serves to investigate the vertical transmission of the virus in vectors and the mechanism of preservation of the virus in nature.

The greater detection of infected females than males can be linked to their hematophagic behavior, as females require human blood for oviposition. Human blood represents an energy source, providing glycoproteins that assist in egg maturation. Therefore, by feeding on blood, the female mosquito may acquire the virus from an infected host or transmit it if previously infected (Lounibos and Kramer, 2016). *Ae. aegypti* are highly susceptible to storing and reproducing CHIKV in various tissues of their bodies, which may facilitate the transmission of the virus from adult individuals to their offspring (Velandia-Romero et al., 2017). *Ae. aegypti* tissues found in the head, thorax, and abdomen are commonly infected with CHIKV. This is because viral replication starts in the midgut, as the virus infects epithelial cells of the mesentery and parental tissues after ingesting infected blood. These cells replicate the virus and spread it to other tissues, including the salivary glands and head, where the proboscis is located through which the mosquito injects saliva before feeding and sucks blood (Hardy, 2020).

During the molecular analyses conducted in the present study, only one male pool of *Ae. aegypti* tested positive for CHIKV. The molecular identification of CHIKV in male mosquitoes reinforces the occurrence of vertical transmission, as males do not exhibit hematophagic behavior. In this way, vertical transmission is one of the mechanisms that maintain virus circulation in nature, as infected females deposit eggs that hatch already infected (Agarwal et al., 2014; Honório et al., 2019). In experimental studies, females were fed blood infected with CHIKV and analyzed over gonotrophic cycles. The vertical transmission rates increased in subsequent reproductive cycles, indicating that viral replication in ovarian tissues is an important factor for egg infection (Agarwal et al., 2014; Dzul-Manzanilla et al., 2015).

As mentioned, the present study is the first to report CHIKV in *Ae. aegypti* in the State of Alagoas, contributing to this survey, which was carried out by few studies in other regions of the country (Costa-da-Silva et al., 2017; Krokovsky et al., 2022; Leandro et al., 2020; Monteiro et al., 2020; Ribeiro Cruz et al., 2020; Silva et al., 2024).

However, our study has some limitations that made our analyses difficult: the first is the time of collection and the second is the low percentage of infected mosquitoes. The first limitation directly involves obtaining infected mosquitoes from CHIKV positive locations, which made it difficult to detect the virus during the procedure. A study carried out by Crespo et al. (2024) revealed that the biological performance of *Ae. aegypti* mosquitoes were negatively affected when they were infected with CHIKV, reducing their longevity and reproductive capacity. This factor may explain the low number of infected mosquitoes collected in regions with Chikungunya cases.

Finally, we constructed a phylogenetic tree with viral genome sequences obtained from mosquitoes, correlating with sequences obtained from human samples. The phylogenetic analyses revealed distinct clustering patterns of *Chikungunya virus* (CHIKV) sequences over time and space, suggesting different transmission dynamics. Samples from Minas Gerais (2022) clustered with sequences from 2023, while those from São Paulo (2024) formed a clade with human sequences from 2023 and 2024, indicating the possible sustained circulation of the virus in these regions. In contrast, samples from Pará (2017) and Sergipe (2016) clustered exclusively with sequences from 2017 and 2018, suggesting punctual introduction events without continuity in subsequent years. These findings may reflect both the local persistence of specific lineages in certain regions and the introduction and disappearance of the virus in others, possibly influenced by epidemiological and environmental factors, as well as human and vector mobility dynamics..

The variation among CHIKV genotypes is crucial for understanding the epidemiology and dynamics of viral infections. The study by Machado et al. (2019) revealed that both the African ECSA and Asian/Caribbean genotypes were simultaneously circulating in the northeastern region of Brazil, specifically in Pernambuco. Through genome sequencing directly from clinical samples, researchers identified evidence of coinfection in individuals, suggesting that the coexistence of different genotypes may be more common than previously thought. This genetic diversity not only complicates the diagnosis and treatment of infections but also may influence the virulence and immune response of hosts. Therefore, understanding the variations among genotypes is essential for developing effective strategies for controlling and preventing future outbreaks (Machado et al., 2019).

Conclusion

Despite its limitations, our results reinforce the importance of virus detection in mosquitoes and suggest, through phylogenetic analyses, that clades are predominantly formed based on geographic and temporal proximity, reflecting the regional dynamics of CHIKV. The clustering of sequences from closely related years indicates sustained virus circulation in certain areas, suggesting continuous local transmission, while the absence of more recent samples in some clades may indicate sporadic introductions without long-term persistence. These findings highlight that CHIKV dispersion is not solely determined by the type of host but also by human mobility, vector ecology, and other epidemiological factors. In addition to viral detection, this study describes the morphological identification of *Aedes aegypti* using an entomological key,

ensuring methodological reproducibility and confirming the accurate identification of the analyzed vector species.

References

- Agarwal, A., Dash, P.K., Singh, A.K., Sharma, S., Gopalan, N., Rao, P.V.L., Parida, M.M., and Reiter, P. (2014). Evidence of Experimental Vertical Transmission of Emerging Novel ECSA Genotype of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2990. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002990>.
- Aragão, C.F., Cruz, A.C.R., Nunes Neto, J.P., Monteiro, H.A. de O., da Silva, E.V.P., da Silva, S.P., Andrade, A.T. dos S., Tadei, W.P., and Pinheiro, V.C.S. (2018). Circulation of Chikungunya virus in *Aedes aegypti* in Maranhão, Northeast Brazil. *Acta Trop.* 186, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.06.022>.
- Aragão, C.F., Pinheiro, V.C.S., Nunes Neto, J.P., Silva, E.V.P. da, Pereira, G.J.G., Nascimento, B.L.S. do, Castro, K. da S., Maia, A.M., Catete, C.P., Martins, L.C., et al. (2019). Natural Infection of *Aedes aegypti* by Chikungunya and Dengue type 2 Virus in a Transition Area of North-Northeast Brazil. *Viruses* 11. <https://doi.org/10.3390/v11121126>.
- Auksornkitti, V., Pongsiri, P., Theamboonlers, A., Rianthavorn, P., Poovorawan, Y., Manujum, K., and Luplertlop, N. (2010). Whole-genome characterisation of Chikungunya virus from *Aedes albopictus* collected in Thailand. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 104, 265–269. <https://doi.org/10.1179/136485910X12647085215778>.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. *Bol Epidemiol.* 2017;48:1-11. [cited 2018 Mar 14]. Available from: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/06/2017-002-Monitoramento-dos-casos-de-dengue-febre-de-chikungunya-e-febre-pelo-v--rus-Zika-ate-a-SemanaEpidemiologica-52--2016.pdf>
- Carrasquilla, M.C., Ortiz, M.I., León, C., Rondón, S., Kulkarni, M.A., Talbot, B., Sander, B., Vásquez, H., Cordovez, J.M., González, C., et al. (2021). Entomological characterization of *Aedes* mosquitoes and arbovirus detection in Ibagué, a Colombian city with co-circulation of Zika, dengue and chikungunya viruses. *Parasit. Vectors* 14, 446. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04908-x>.
- Consoli, R.A.G.B., and Oliveira, R.L. de (1994). Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil (Rio de Janeiro: Editora Fiocruz).

- Costa-da-Silva, A.L., Ioshino, R.S., Petersen, V., Lima, A.F., Cunha, M. dos P., Wiley, M.R., Ladner, J.T., Prieto, K., Palacios, G., Costa, D.D., et al. (2017). First report of naturally infected *Aedes aegypti* with chikungunya virus genotype ECSA in the Americas. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *11*, e0005630. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005630>.
- Crespo, M., Guedes, D., Paiva, M., Sobral, M., Helvecio, E., Alves, R., Tadeu, G., Oliveira, C., Melo-Santos, M.A.V., Barbosa, R., et al. (2024). Exposure to Zika and chikungunya viruses impacts aspects of the vectorial capacity of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *PLoS One* *19*, e0281851. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281851>.
- Cunha, M.S., Costa, P.A.G., Correa, I.A., de Souza, M.R.M., Calil, P.T., da Silva, G.P.D., Costa, S.M., Fonseca, V.W.P., and da Costa, L.J. (2020). Chikungunya Virus: An Emergent Arbovirus to the South American Continent and a Continuous Threat to the World. *Front. Microbiol.* *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01297>.
- Dzul-Manzanilla, F., Martínez, N.E., Cruz-Nolasco, M., Gutiérrez-Castro, C., López-Damián, L., Ibarra-López, J., Martini-Jaimes, A., Bibiano-Marín, W., Tornez-Benitez, C., Vazquez-Prokopec, G.M., et al. (2015). Evidence of vertical transmission and co-circulation of chikungunya and dengue viruses in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Guerrero, Mexico: Table 1. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *trv106*. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trv106>.
- Felsenstein, J. (1985). CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP. *Evolution* (N. Y). *39*, 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.
- Hapuarachchi, H.C., Wong, W.-Y., Koo, C., Tien, W.-P., Yeo, G., Rajarethinam, J., Tan, E., Chiang, S., Chong, C.-S., Tan, C.-H., et al. (2021). Transient transmission of Chikungunya virus in Singapore exemplifies successful mitigation of severe epidemics in a vulnerable population. *Int. J. Infect. Dis.* *110*, 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.08.007>.
- HARBACH, R.E. (2007). The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny*. *Zootaxa* *1668*. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1668.1.28>.
- Hardy, J.L. (2020). Susceptibility and Resistance of Vector Mosquitoes. In *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, (CRC Press), pp. 87–126.
- Honório, N.A., Wiggins, K., Eastmond, B., Câmara, D.C.P., and Alto, B.W. (2019). Experimental Vertical Transmission of Chikungunya Virus by Brazilian and Florida *Aedes Albopictus* Populations. *Viruses* *11*, 353. <https://doi.org/10.3390/v11040353>.

- Intayot, P., Phumee, A., Kraivichian, K., Sor-suwan, S., Boonserm, R., and Siriyasatien, P. (2021). Genetic characterization of chikungunya virus isolates from *Aedes aegypti* mosquitoes collected during a recent outbreak in Bangkok, Thailand. *Arch. Virol.* 166, 3387–3398. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05243-3>.
- Katoh, K., and Standley, D.M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.
- Krokovsky, L., Paiva, M.H.S., Guedes, D.R.D., Barbosa, R.M.R., de Oliveira, A.L.S., Anastácio, D.B., Pontes, C.R., and Ayres, C.F.J. (2022). Arbovirus Surveillance in Field-Collected Mosquitoes From Pernambuco-Brazil, During the Triple Dengue, Zika and Chikungunya Outbreak of 2015-2017. *Front. Trop. Dis.* 3. <https://doi.org/10.3389/fitd.2022.875031>.
- Larsson, A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* 30, 3276–3278. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>.
- Le, B.C.T., Ekalaksananan, T., Thaewnongiew, K., Phanthanawiboon, S., Aromseree, S., Phanitchat, T., Chuerduangphui, J., Suwannatrai, A.T., Alexander, N., Overgaard, H.J., et al. (2020). Interepidemic Detection of Chikungunya Virus Infection and Transmission in Northeastern Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 103, 1660–1669. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0293>.
- Leandro, A. de S., Britto, A. da S., Rios, J.A., Galvão, S.R., Kafka, R., de Oliveira, W.F., Neto, O.F., Silva, I., Delai, R.M., Gonçalves, D.D., et al. (2020). Molecular Detection of Dengue Virus in Mosquitoes as an Early Indicator to Aid in the Prevention of Human Infection in Endemic Areas. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 20, 54–59. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2411>.
- Leparc-Goffart, I., Nougairede, A., Cassadou, S., Prat, C., and de Lamballerie, X. (2014). Chikungunya in the Americas. *Lancet* 383, 514. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60185-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60185-9).
- Lounibos, L.P., and Kramer, L.D. (2016). Invasiveness of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* and Vectorial Capacity for Chikungunya Virus. *J. Infect. Dis.* 214, S453–S458. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw285>.
- Machado, L.C., de Moraes-Sobral, M.C., Campos, T. de L., Pereira, M.R., de Albuquerque, M. de F.P.M., Gilbert, C., Franca, R.F.O., and Wallau, G.L. (2019). Genome sequencing reveals coinfection by multiple chikungunya virus genotypes in a recent outbreak in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0007332.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007332>.

- Martin, J.L., Lippi, C.A., Stewart-Ibarra, A.M., Ayala, E.B., Mordecai, E.A., Sippy, R., Heras, F.H., Blackburn, J.K., and Ryan, S.J. (2021). Household and climate factors influence *Aedes aegypti* presence in the arid city of Huaquillas, Ecuador. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *15*, e0009931. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009931>.
- Monteiro, F.J.C., Mourão, F.R.P., Ribeiro, E.S.D., Rêgo, M.O. da S., Frances, P.A. da C., Souto, R.N.P., Façanha, M. dos S., Tahmasebi, R., and Costa, A.C. da (2020). Prevalence of dengue, Zika and chikungunya viruses in *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) in a medium-sized city, Amazon, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* *62*. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946202062010>.
- Morrison, A.C., Gray, K., Getis, A., Astete, H., Sihuincha, M., Focks, D., Watts, D., Stancil, J.D., Olson, J.G., Blair, P., et al. (2004). Temporal and Geographic Patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Production in Iquitos, Peru. *J. Med. Entomol.* *41*, 1123–1142. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.6.1123>.
- Nanakorn, N., Pengsakul, T., Bunrod, K., Thammapalo, S., Prikchoo, P., Vongpunsawad, S., and Poovorawan, Y. (2021). Chikungunya Fever in Southern Thailand, 2018. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *105*, 955–959. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.21-0436>.
- Nunes, M.R.T., Faria, N.R., de Vasconcelos, J.M., Golding, N., Kraemer, M.U., de Oliveira, L.F., Azevedo, R. do S. da S., da Silva, D.E.A., da Silva, E.V.P., da Silva, S.P., et al. (2015). Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med.* *13*, 102. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0348-x>.
- Okonechnikov, K., Golosova, O., and Fursov, M. (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* *28*, 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>.
- Phumee, A., Intayot, P., Sor-Suwan, S., Jittmittraphap, A., and Siriyasatien, P. (2021). Molecular detection of Indian Ocean Lineage Chikungunya virus RNA in field collected *Culex quinquefasciatus* Say from Bangkok, Thailand but no evidence of virus replication. *PLoS One* *16*, e0246026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246026>.
- Ribeiro Cruz, A.C., Pinto Nunes Neto, J., Patroca da Silva, S., Vieira Pinto da Silva, E., Juscely Galvão Pereira, G., Maia Santos, M., Antônio de Oliveira Monteiro, H., Barreto dos Santos, F., José de Paula Souza e Guimarães, R., Fortes Aragão, C., et al. (2020). Chikungunya virus Detection in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* during an Outbreak in the Amazon Region. *Viruses* *12*, 853. <https://doi.org/10.3390/v12080853>.
- Robinson, M.C. (1955). An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika

- territory, in 1952–1953. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 49, 28–32. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(55\)90080-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(55)90080-8).
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
- Selhorst, P., Makiala-Mandanda, S., De Smet, B., Mariën, J., Anthony, C., Binene-Mbuka, G., De Weggheleire, A., Ilombe, G., Kinganda-Lusamaki, E., Pukuta-Simbu, E., et al. (2020). Molecular characterization of chikungunya virus during the 2019 outbreak in the Democratic Republic of the Congo. *Emerg. Microbes Infect.* 9, 1912–1918. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1810135>.
- Silva, D.M.F. Da, Curcio, J.S. de, Silva, L. do C., Sousa, F.B. de, Anunciação, C.E., Furlaneto, S.M.S.-I., Silva, V.P.S.M., Garcia-Zapata, M.T.A., and Silveira-Lacerda, E. de P. (2024). Detection of arboviruses in *Aedes aegypti* through transovarian analysis: A study in Goiânia, Goiás. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 57. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0280-2023>.
- Souza, T.M.A., Azeredo, E.L., Badolato-Corrêa, J., Damasco, P.V., Santos, C., Petitinga-Paiva, F., Nunes, P.C.G., Barbosa, L.S., Cipitelli, M.C., Chouin-Carneiro, T., et al. (2017). First Report of the East-Central South African Genotype of Chikungunya Virus in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Curr.* <https://doi.org/10.1371/currents.outbreaks.4200119978d62ccaa454599cd2735727>.
- Souza, T.M.L., Vieira, Y.R., Delatorre, E., Barbosa-Lima, G., Luiz, R.L.F., Vizzoni, A., Jain, K., Miranda, M.M., Bhuvu, N., Gogarten, J.F., et al. (2019). 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.* 9, 2760. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39406-9>.
- de Souza, W.M., de Lima, S.T.S., Simões Mello, L.M., Candido, D.S., Buss, L., Whittaker, C., Claro, I.M., Chandradeva, N., Granja, F., de Jesus, R., et al. (2023). Spatiotemporal dynamics and recurrence of chikungunya virus in Brazil: an epidemiological study. *The Lancet Microbe* 4, e319–e329. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(23\)00033-2](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00033-2).
- 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. (2024). Chikungunya: a decade of burden in the Americas. *Lancet Reg. Heal. - Am.* 30, 100673. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2023.100673>.
- Tamura, K., Nei, M., and Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by

- using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 11030–11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>.
- Tamura, K., Stecher, G., and Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* *38*, 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Tanabe, E.L. de L., Tanabe, I.S.B., Santos, E.C. dos, Marques, J.P. da S., Borges, A.A., Lima, M.C. de, Anderson, L., and Bassi, Ê.J. (2018). Report of East-Central South African Chikungunya virus genotype during the 2016 outbreak in the Alagoas State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* *60*. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201860019>.
- Teixeira, M.G., Andrade, A.M.S., Costa, M. da C.N., Castro, J.S.M., Oliveira, F.L.S., Goes, C.S.B., Maia, M., Santana, E.B., Nunes, B.T.D., and Vasconcelos, P.F.C. (2015). East/Central/South African Genotype Chikungunya Virus, Brazil, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* *21*, 906–907. <https://doi.org/10.3201/eid2105.141727>.
- Vasconcelos, P.F. da C. (2014). Emergência do vírus Chikungunya: risco de introdução no Brasil. *Rev. Pan-Amazônica Saúde* *5*. <https://doi.org/10.5123/S2176-62232014000300001>.
- Velandia-Romero, M.L., Olano, V.A., Coronel-Ruiz, C., Cabezas, L., Calderón-Peláez, M.A., Castellanos, J.E., and Matiz, M.I. (2017). Dengue virus detection in *Aedes aegypti* larvae and pupae collected in rural areas of Anapoima, Cundinamarca, Colombia. *Biomédica* *37*, 193. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i0.3584>.
- White, S.K., Mavian, C., Salemi, M., Morris, J.G., Elbadry, M.A., Okech, B.A., Lednicky, J.A., and Dunford, J.C. (2018). A new “American” subgroup of African-lineage Chikungunya virus detected in and isolated from mosquitoes collected in Haiti, 2016. *PLoS One* *13*, e0196857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196857>.
- World Health Organization (2024). Global Arbovirus Initiative: preparing for the next pandemic by tackling mosquito-borne viruses with epidemic and pandemic potential (Geneva).

5. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E. C. et al. Large-scale Epidemiological modeling: Scanning for Mosquito-Borne Diseases Spatio-temporal Patterns in Brazil. Disponível em: <https://arxiv.org/abs/2407.21286/>.
- BRASIL. Chikungunya. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/chikungunya/>.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Febre de chikungunya: manejo clínico. Secretaria de Atenção Básica. - Brasília, DF 2015. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/>, 18 out 2016.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 24 de 2022. *Ministério da Saúde - Boletim Epidemiológico*, v. 53, p. 1–14, 2022.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento das arboviroses e balanço de encerramento do Comitê de Operações de Emergência (COE) Dengue e outras Arboviroses 2024. *Boletim Epidemiológico - Volume 55 - nº 11*. 2024.
- CAMPOS, R. K. (2015). Molecular biology of Chikungunya virus: Replication, pathogenesis, and antiviral strategies. In M. L. M. Costa (Ed.), *Chikungunya Virus: Advances in Biology, Pathogenesis, and Treatment* (pp. 45-68).
- CARVALHO, R. G., Lourenço-de-Oliveira, R., & Braga, I. A. (2014). Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(6), 787-796. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140304>.
- CASTRO, A. P. C. R. de; LIMA, R. A.; NASCIMENTO, J. dos S. Chikungunya: vision of the pain clinician. *Revista Dor*, v. 17, n. 4, p. 299–302, 2016.
- DE LIMA, S. T. S. et al. Fatal Outcome of Chikungunya Virus Infection in Brazil. *Clinical Infectious Diseases*, v. 73, n. 7, p. e2436–e2443, 7 ago. 2020.
- DÍAZ-QUIÑONEZ, J. A. et al. Caracterización clínica y epidemiológica de fiebre chikungunya en México. *Revista Panamericana de Salud Pública*, v. 41, p. 1, 1 jul. 2017.

- DONALISIO, M. R., & FREITAS, A. R. R. (2015). Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 18(1), 283-285. <https://doi.org/10.1590/1980-5497201500010021>.
- ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control. Chikungunya monthly update. 2024. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/chikungunya-monthly>.
- FONSECA, D. M., SMITH, J. L., WILKERSON, R. C., & FLEISCHER, R. C. (2019). Pathways of expansion and multiple introductions illustrated by large genetic differentiation among worldwide populations of the southern house mosquito. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(2), 434-442. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0621>.
- GARAY-MORÁN, C. et al. Caracterización clínica y epidemiológica de fiebre chikungunya en México [Clinical and epidemiological characterization of chikungunya fever in Mexico]. *Revista Panamericana de Salud Pública*, v. 41, p. e58, 21 ago. 2017. DOI: 10.26633/RPSP.2017.58.
- HALSTEAD SB, Udomsakdi S, Scanlon JE, Rohitayodhin S. Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962–1964. V. Epidemiologic observations outside Bangkok. *Am J Trop Med Hyg*. 1969;18(6):1022–33.
- HONÓRIO, N. A. et al. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 31, p. 906–908, 1 maio 2015.
- KHAN, A. H., MORITA, K., PARQUET, M. D. C., HASEBE, F., MATHENGE, E. G. M., & IGARASHI, A. (2002). Complete nucleotide sequence of Chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *Journal of General Virology*, 83(12), 3075-3084. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-12-3075>.
- KHONGWICHIT, S., CHANSAENROJ, J., THONGMEE, T., BENJAMANUKUL, S., WANLAPAKORN, N., CHIRATHAWORN, C., & POOVORAWAN, Y. (2021). Chikungunya virus infection: molecular biology, clinical characteristics, and epidemiology in Asian countries. *Journal of Biomedical Science*, 28(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00778-8>.
- KUHN, R. J. Togaviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (eds.). *Fields Virology*. Filadélfia: Lippincott, Williams e Wilkins, 2013. p. 629–650.

- KRAEMER, M. U. G., SINKA, M. E., DUDA, K. A., MYLNE, A. Q. N., SHEARER, F. M., BARKER, C. M., ... & Hay, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife*, 4, e08347. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>.
- MACIEL, D. E. F., OLIVEIRA, R. A., CASTRO, F. M., & LIMA, C. A. (2020). The role of *Aedes albopictus* in the transmission of Chikungunya virus in rural and suburban areas: A review. *Tropical Medicine and International Health*, 25(3), 268-275. <https://doi.org/10.1111/tmi.13358>.
- NIMMANNITYA, S., HALSTEAD, S. B., COHEN, S. N., & MARGIOTTA, M. R. (1969). Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962–1964. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 18(6), 954-971. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1969.18.954>.
- NO. No Ceará, chikungunya matou mais do que dengue em uma década. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2023-04/no-ceara-chikungunya-matou-mais-do-que-dengue-em-uma-decada>.
- OUÉDRAOGO, W. M. et al. Impact of physicochemical parameters of *Aedes aegypti* breeding habitats on mosquito productivity and the size of emerged adult mosquitoes in Ouagadougou City, Burkina Faso. *Parasites & Vectors*, v. 15, n. 1, 20 dez. 2022.
- OMS. A escalada da chikungunya nas Américas: 3,7 milhões de casos em uma década. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/a-escalada-da-chikungunya-nas-americas-37-milhoes-de-casos-em-uma-decada/>.
- PRESTI, A. L., CELLA, E., GIOVANETTI, M., Lai, A., ANGELETTI, S., ZEHENDER, G., & CICCIOZZI, M. (2014). Origin, evolution, and phylogeography of recent epidemic CHIKV strains. *Infection, Genetics and Evolution*, 23, 166-173. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.02.003>.
- REZZA, G., NICOLETTI, L., ANGELINI, R., ROMI, R., FINARELLI, A. C., PANNING, M., MAJORI, G. (2006). Infection with chikungunya virus in Italy: An outbreak in a temperate region. *The Lancet*, 370(9602), 1840-1846. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61779-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61779-6).

- SANTOS, M. A. et al. Spatial analysis of Chikungunya fever incidence and the associated socioeconomic, demographic, and vector infestation factors in municipalities of Pernambuco, Brazil, 2015–2021. v. 26, 1 jan. 2023.
- SANTOS, V. S. O. et al. Incidência de casos de chikungunya nos estados do nordeste brasileiro nos anos de 2018 a 2022. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 2024. DOI: 10.9771/cmbio.v23i2.58687.
- SHIRAKO, Y.; STRAUSS, E. G.; STRAUSS, J. H. Suppressor mutations that allow Sindbis virus RNA polymerase to function with non-aromatic amino acids at the N-terminal: evidence for interaction between nsP1 and nsP4 in negative-strand RNA synthesis. *Virology*, v. 276, p. 148–160, 2000.
- SHIRAKO, Y., NIKLASSON, B., DALRYMPLE, J. M., STRAUSS, E. G., & STRAUSS, J. H. (2000). Structure and organization of the Sindbis virus genome. *Journal of Virology*, 74(16), 7314-7326. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.16.7314-7326>. 2000.
- SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *Journal of Clinical Investigation*, v. 127, n. 3, p. 737–749, 1 mar. 2017.
- SILVA, J. V. J., Ludwig-Begall, L. F., OLIVEIRA-FILHO, E. F., OLIVEIRA, R. A. S., DURÃES-CARVALHO, R., LOPES, T. R., GIL, L. H. V. G. A scoping review of Chikungunya virus infection: epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. *Acta Tropica*, 188, 213-224. (2018). <https://doi.org/10.1016/j.actatropica>.
- SILVA et al. Mapa de evidências sobre tratamento da chikungunya. *Revista Panamericana de Salud Pública*, v. 48, p. 1–1, 18 out. 2024.
- STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. Os alfavírus: expressão genética, replicação e evolução. *Revista Microbiológica*, v. 58, p. 491–562, 1994.
- STAPLES, J. ERIN; BREIMAN, ROBERT F.; POWERS, ANN M. Chikungunya Fever: An Epidemiological Review of a Re-Emerging Infectious Disease. *Clinical Infectious Diseases*, v. 49, n. 6, p. 942–948, 15 set. 2009.

- TOMAR, S. et al. Heterologous production, purification, and characterization of enzymatically active Sindbis virus nonstructural protein nsP1. *Protein Expr. Purif.*, v. 79, p. 277–284, 2011.
- TSETSARKIN, K. A., VANLANDINGHAM, D. L., MCGEE, C. E., & HIGGS, S. (2007). A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathogens*, 3(12), e201. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030201>.
- Voss, J. E., Vaney, M. C., Duquerroy, S., Vonnheim, C., Girard-Blanc, C., Crublet, E., ... & Rey, F. A. (2010). Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature*, 468(7324), 709-712. <https://doi.org/10.1038/nature09555>.
- WORLD. Chikungunya. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya/>.
- ZANLUCA, C., dos SANTOS, C. N. D. (2019). Chikungunya virus: an emergent arbovirus to the South American continent and a continuous threat to the world. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2887. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02887>.