



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

CLAUDIO MORAIS SIQUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL DOS CASOS DE DENGUE
E ZIKA EM UMA COORTE EM GOIÂNIA, GOIÁS, BRASIL, 2015–2019**

**Goiânia
2020**



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das dissertações e teses disponibilizados são de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o autor e o orientador firmam o compromisso de que ele não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese:

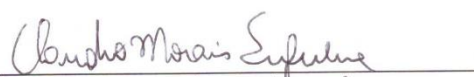
Nome completo do autor: **Claudio Morais Siqueira**

Título do trabalho: **Caracterização clínico-laboratorial dos casos de dengue e Zika em uma coorte em Goiânia, Goiás, Brasil, 2015-2019**

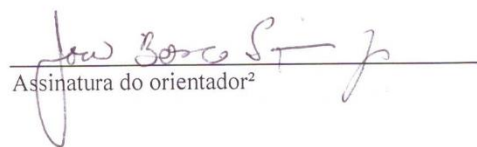
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [] SIM NÃO¹

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


 Assinatura do autor²

Ciente e de acordo:


 Assinatura do orientador²

Data: 14 / 02 / 2020.

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

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

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

CLAUDIO MORAIS SIQUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL DOS CASOS DE DENGUE
E ZIKA EM UMA COORTE EM GOIÂNIA, GOIÁS, BRASIL, 2015–2019**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás como pré-requisito para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientador: Dr. João Bosco Siqueira Júnior

**Goiânia
2020**

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

Siqueira, Claudio Morais

Caracterização clínico-laboratorial dos casos de dengue e Zika em uma coorte em Goiânia, Goiás, Brasil, 2015-2019 [manuscrito] / Claudio Morais Siqueira. - 2020.

xvi, 114 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. João Bosco Siqueira-Jr.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, , Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2020.

Bibliografia. Anexos.

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

1. Dengue. 2. Zika. 3. Sinais e Sintomas. 4. Estudos Longitudinais. I. Siqueira-Jr, João Bosco , orient. II. Título.

CDU 614

ATA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
 INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
 Rua 239, s/n - Setor Universitário - Goiânia/GO - CEP. 74.603-050
 Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 - Fax: (62) 3209.6363 - e-mail: ppmtrop@ufg.br

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE CLAUDIO MORAIS SIQUEIRA - Aos quatorze dias do mês de fevereiro do ano de 2020 (14/02/2020), às 14:00h, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. JOÃO BOSCO SIQUEIRA JÚNIOR, ADRIANA OLIVEIRA GUILARDE, KLEBER GIOVANNI LUZ, EXPEDITO JOSÉ DE ALBUQUERQUE LUNA e GIOVANINI EVELIM COELHO para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada na FACULDADE DE MEDICINA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: "Caracterização clínico-laboratorial dos casos de dengue e Zika em uma coorte em Goiânia, Goiás, Brasil, 2015-2019" em nível de DOUTORADO, área de concentração em: CIÊNCIAS BÁSICAS E APLICADAS EM DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS E SAÚDE PÚBLICA: DOENÇAS INFECIOSAS E PARASITÁRIAS, de autoria de CLAUDIO MORAIS SIQUEIRA discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador Prof. Dr. João Bosco Siqueira Júnior, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em 30 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1481/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando o candidato **Aprovado** ou **Reprovado**:

Banca Examinadora	Aprovado / Reprovado
Prof. Dr. João Bosco Siqueira Júnior	<u>APROVADO</u>
Prof. Dra. Adriana Oliveira Guilarde	<u>aprovado</u>
Prof. Dr. Kleber Giovanni Luz	<u>APROVADO</u>
Prof. Dr. Expedito José de Albuquerque Luna	<u>APROVADO</u>
Prof. Dr. Giovanini Evelim Coelho	<u>APROVADO</u>

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato aprovado (Habilitado ou não Habilitado), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de DOUTOR EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, na área de concentração em CIÊNCIAS BÁSICAS E APLICADAS EM DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS E SAÚDE PÚBLICA: DOENÇAS INFECIOSAS E PARASITÁRIAS, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 14h15min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor. A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Prof. Dr. João Bosco Siqueira Júnior (IPTSP/UFG): João Bosco Siqueira Júnior
 Prof. Dra. Adriana Oliveira Guilarde (IPTSP/UFG): Adriana Oliveira Guilarde
 Prof. Dr. Kleber Giovanni Luz (UFRN): Kleber Giovanni Luz
 Prof. Dr. Expedito José de Albuquerque Luna (IPTSP/UFG): Expedito José de Albuquerque Luna
 Dr. Giovanini Evelim Coelho (OPAS): Giovanini Coelho
 Secretária da Pós-Graduação: Helôisa de Sousa Vieira

*Dedico este estudo aos companheiros de
jornada que colaboraram direta ou
indiretamente para que os objetivos nele
propostos fossem atingidos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao orientador Dr. João Bosco Siqueira Júnior pelo apoio que me ofereceu nos momentos decisivos do processo de aprendizado, sem o qual não teria terminado esta etapa em minha formação profissional.

Agradeço à equipe de trabalho desse projeto, especialmente os integrantes da faculdade de Farmácia da UFG, pela oportunidade de um convívio respeitoso e pelo constante apoio recebido de todos.

Agradeço aos membros da banca de qualificação por suas importantes contribuições neste trabalho.

Aos professores do Programa de Doutorado do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG), direciono meu reconhecimento por todos os ensinamentos que me proporcionaram neste tempo de interação.

Aos demais integrantes do Programa de Doutorado do IPTSP da UFG, o reconhecimento da competência, seriedade e discernimento com que exercem suas funções.

Agradeço ternamente à doutora Ana Laura de Sene Amâncio Zara e à coordenadora Sueli Meira da Silva e demais parceiras do Laboratório Margarida Doblner Komma do IPTSP/UFG pelo auxílio incondicional de sempre, esperando um dia poder retribuir de alguma forma os benefícios que delas recebi.

A todos os membros da equipe do projeto meu agradecimento pela compreensão e paciência nos compromissos do dia-a-dia. Obrigado pelo respeito que entre nós sempre preponderou!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1.1 DOENÇAS INFECCIOSAS	1
1.2 DENGUE	2
1.2.1 Etiologia e patogenia	2
1.2.2 Vetor, ciclo biológico e transmissão	4
1.2.3 Características clínicas	5
1.2.4 Investigação laboratorial	7
1.2.5 Dengue na infância e adolescência: algumas especificidades.....	10
1.2.6 Aspectos epidemiológicos.....	11
1.3 ZIKA	16
1.3.1 Vetor, transmissão, etiologia e aspectos virológicos.....	16
1.3.2 Características clínicas	17
1.3.3 Investigação laboratorial	18
1.3.4 Aspectos epidemiológicos.....	19
1.3.5 Zika e microcefalia.....	20
1.4 VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DA DENGUE E ZIKA.....	21
1.5 MEDIDAS DE CONTROLE DO VETOR.....	23
1.6 PERSPECTIVAS VACINAIS PARA DENGUE E ZIKA	26
1.7 DENGUE/ZIKA: ESTUDOS DE COORTE: PROPORÇÃO DE CASOS ASSINTOMÁTICOS E POTENCIAL DE AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	27
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos	32
4 RESULTADOS	33
4.1 Artigo 1	34
4.2 Artigo 2	51
4.3 Artigo 3	69
4.4 Artigo 4	85
5 DISCUSSÃO	95
6 CONCLUSÕES	97

REFERÊNCIAS.....	98
ANEXOS	114
ANEXO A. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	114

FIGURAS, TABELAS E ANEXOS

FIGURAS

Figura 1. Casos prováveis e hospitalizações por dengue. Brasil, 1986-2019	13
--	----

TABELAS

Tabela 1. Diferenciação dos sinais e sintomas e laboratorial descrita no Guia de Vigilância Epidemiológica, Brasil, 2019	18
---	----

Tabela 2. Proporção de infecções inaparentes e casos assintomáticos	29
--	----

ANEXOS

Anexo A. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	114
--	-----

SIGLAS E ABREVIATURAS

Anti-ZIKV	Anticorpos da Zika Vírus
C	Proteína do capsídeo do vírus da dengue
CHIKV	Vírus da Chikungunya
CYD-TDV	Vacina de Dengue Tetravalente da Sanofi Pasteur
DDA	Doença Diarreica Aguda
DENV	Vírus da Dengue
DENV1	Vírus da Dengue 1
DENV2	Vírus da Dengue 2
DENV3	Vírus da Dengue 3
DENV4	Vírus da Dengue 4
DENV5	Vírus da Dengue 5
E	Proteína do envelope viral
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> - Ensaio de Imunoabsorção enzimática
Fc γ	Receptor Fc gama
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FHD	Febre Hemorrágica do Dengue
FII	Ficha Individual de Investigação
FIN	Ficha Individual de Notificação
IF	Imunofluorescência
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IHQ	Imuno-histoquímica
IP10	<i>Interferon Gamma-induced Protein 10</i>
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
IRA	Infecções Respiratórias Agudas
M	Proteína da membrana do vírus da dengue
NIH	<i>National Institute of Health</i> – Instituto Nacional de Saúde
NS1	Proteína da cápsula viral do tipo NS1
NS3	Proteína da cápsula viral do tipo NS3

NS5	Proteína da cápsula viral do tipo NS5
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAHO/OPAS	<i>Pan American Health Organization</i> - Organização Pan-Americana de Saúde
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> – Reação da Cadeia de Polimerase
Pré-M	Proteína da cápsula viral
PRNT	<i>Plaque Reduction Neutralization Test</i> - Testes de Neutralização de Redução de Placa
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction</i> – Reação de Transcrição Reversa da Cadeia de Polimerase
Sinan	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TDV	Vacina de Dengue Tetraivalente
Th1	T <i>helper</i> 1 – linfócito T CD4 auxiliar 1
UBV	Nebulização Ultra Baixo Volume
UFG	Universidade Federal de Goiás
VPP	Valor Preditivo Positivo
ZIKV	Zika Vírus

RESUMO

Caracterização clínico-laboratorial dos casos de dengue e Zika em uma coorte em Goiânia, Goiás, Brasil, 2015–2019

Introdução: a dengue é a arbovirose mais importante do mundo devido à sua carga de morbimortalidade e é hiperendêmica/epidêmica no Brasil. O vírus da Zika está presente em países tropicais e subtropicais e, em 2016, houve uma preocupante epidemia brasileira. A co-circulação pelos vírus da dengue e Zika, por serem similares, torna o diagnóstico e o tratamento um desafio para os serviços de saúde. **Objetivos:** apresentar as estratégias de condução de uma coorte na cidade de Goiânia, Goiás; apresentar a sazonalidade das condições febris avaliadas e caracterizar os padrões de apresentação clínico-laboratorial dos casos confirmados de dengue e Zika e de coinfeção dessas arboviroses. **Métodos:** realizou-se uma coorte prospectiva entre 2015 e 2019. A febre foi monitorada semanalmente por telefonemas e por contato direto com o médico assistente. Foi utilizada a pesquisa de anticorpos IgG anti-dengue para um inquérito inicial e outros anuais. Pesquisa de antígeno NS1, de anticorpos IgM anti-dengue e de anticorpos neutralizantes pelo teste de neutralização por redução de placas e pesquisa do genoma viral pela RT-PCR foram os testes de confirmação para a infecção aguda de dengue. Utilizou-se a RT-PCR para a confirmação das infecções pelo Zika vírus. **Resultados:** Uma parceria entre a academia e os serviços públicos de saúde foi adotada e a participação das equipes de Saúde da Família foi essencial para a devida condução do estudo. Em troca, os pesquisadores beneficiaram os Serviços de Saúde através de atividades de vigilância e atenção à saúde. As infecções respiratórias agudas (IRA) representaram 53,0% e as pneumonias 1,7% do total de 1268 casos febris, sendo ambas mais frequentes no outono. A doença diarreica aguda (DDA) representou 8,7% do total e foi mais frequente no verão. Dengue e Zika representaram, respectivamente, 11,6% e 6,1% de todos os casos e predominaram nos meses chuvosos. Neste estudo, foram confirmados 206 casos de dengue. 80,6% apresentaram e 19,4% não apresentaram critérios clínicos que preencheram a definição de caso suspeito de dengue. O exantema estava presente em 45,9% dos 37 casos confirmados de Zika. Leucopenia e ausência de plaquetopenia predominaram nos casos de dengue e Zika. Os valores preditivos positivos para a suspeita clínica de dengue e Zika foram de 85,8% e 16,5%, respectivamente. Seis casos de

coinfecção dengue/Zika foram confirmados. Cinco deles apresentaram sintomatologia compatível com suspeita de Zika e um de dengue. Entre os casos de coinfecção, houve predomínio de leucopenia e de plaquetas normais. **Conclusões:** A parceria interinstitucional academia e serviços de saúde foi bem-sucedida, com benefícios para as duas instituições. Descrições anteriores do perfil sazonal das IRA, pneumonias, dengue e Zika estavam de acordo com os resultados desta pesquisa. A sintomatologia de indivíduos infectados pelos vírus da dengue e Zika pode não preencher os critérios de casos suspeitos dessas arboviroses e casos de coinfecção de dengue/Zika podem atender aos critérios de suspeita de ambas, o que favorece enganos no diagnóstico clínico. Em áreas de co-circulação desses vírus, o uso de testes laboratoriais específicos é importante para se prevenir e tratar adequadamente essas doenças.

Palavras-chave: Dengue; Zika; Sinais e Sintomas; Estudos Longitudinais.

ABSTRACT

Title: Clinical and laboratory characterization of dengue and Zika cases in a cohort in Goiânia, Goiás, Brazil, 2015–2019

Introduction: *dengue is the most important arbovirus in the world due to its morbidity and mortality burden and is hyperendemic/epidemic in Brazil. Zika virus is present in tropical and subtropical countries and, in 2016, there was a worrying Brazilian epidemic. The co-circulation of dengue and Zika viruses, because they are similar, makes diagnosis and treatment a challenge for health services. Objectives:* *to present the strategies of conducting a cohort in the city of Goiania, Goias; present the seasonality of febrile conditions evaluated and characterize the patterns of clinical and laboratory presentation of confirmed cases of dengue and Zika and of coinfection of these arboviruses. Methods:* *a prospective cohort was carried out between 2015 and 2019. Fever was monitored weekly by phone calls and by direct contact with the attending physician. IgG anti-dengue antibodies were used for an initial survey and other annual surveys. Testing of NS1 antigen, IgM anti-dengue antibodies and neutralizing antibodies by the plaque reduction neutralization test, and the viral genome by RT-PCR were the confirmatory tests for acute dengue infection. RT-PCR was used for diagnostic confirmation of Zika virus infections. Results:* *A partnership between the academy and public health services was adopted and the participation of Family Health Teams was essential for the proper conduct of the study. In return, the researchers benefited the Health Services through surveillance and health care activities. Acute respiratory infections (ARI) represented 53.0% and pneumonia 1.7% of the total of 1268 febrile cases, both of which were more frequent in the fall. Acute diarrheal disease (ADI) represented 8.7% of the total and was more frequent in the summer. Dengue and Zika represented, respectively, 11.6% and 6.1% of all cases and predominated in rainy months. 206 dengue cases were confirmed in this study. 80.6% presented and 19.4% did not present clinical criteria that met the definition of a suspected case. The rash was present in 45.9% of 37 confirmed cases of Zika. Leukopenia and absence of thrombocytopenia predominated in dengue and Zika cases. The positive predictive values for the clinical suspicion of dengue and Zika were 85.8% and 16.5%, respectively. Six cases of dengue/Zika co-infection were confirmed. Five of them had symptoms compatible*

*with suspected Zika and one of dengue. Among cases of co-infection, leukopenia and normal platelets predominated. **Conclusions:** The interinstitutional partnership between academia and Health Services was successful, with benefits for both institutions. Previous descriptions of the seasonal profile of ARI, pneumonia, dengue and Zika were in agreement with the results of this research. The symptoms of individuals infected by the dengue and Zika viruses may not meet the criteria for suspected cases of these arboviruses and cases of dengue/Zika coinfection may meet the criteria for suspicion of both, which favors mistakes in the clinical diagnosis. In areas of co-circulation of these viruses, the use of specific laboratory tests is important to prevent and treat adequately these diseases.*

Keywords: *Dengue; Zika; Signs and Symptoms; Longitudinal Studies.*

APRESENTAÇÃO

O Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG) desenvolve uma linha de pesquisa em dengue há aproximadamente 22 anos. Diversos estudos foram realizados envolvendo epidemiologia, vigilância, aspectos clínicos, laboratoriais, qualidade de vida dos pacientes e custos da doença.

Sob a coordenação dos professores Dr. Claudio Panutti, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, e Dr. João Bosco Siqueira Júnior, do IPTSP da UFG, foi iniciado, em 2014, um projeto de pesquisa intitulado “Estudo de Incidência de dengue no Brasil, em municípios de alta e média endemicidade: Goiânia–GO e Araraquara-SP”. Esse foi um estudo multicêntrico que teve como objetivo inicial avaliar a dinâmica de transmissão da dengue na população de dois a 16 anos, antes da potencial introdução de uma vacina contra a doença. Entretanto, em 2016, houve em Goiânia uma mudança no cenário clínico-epidemiológico das arboviroses com a introdução do Zika vírus (ZIKV) e possível reação cruzada entre os resultados sorológicos para dengue e Zika. Existiu então a introdução de novo objetivo que visou uma análise clínico-laboratorial dos casos sintomáticos de dengue e Zika.

O contexto geral do estudo previu o recrutamento de uma coorte de indivíduos em cada centro participante. O acompanhamento dessa coorte permitiu uma maior compreensão do comportamento clínico-laboratorial dessas arboviroses em um cenário de alta endemicidade de dengue.

O estudo iniciou com a realização de um inquérito sorológico inicial para a determinação da prevalência de infecção pelo DENV. Em seguida, foi realizado um monitoramento semanal de febre dos participantes do estudo para identificação de casos incidentes de dengue e avaliação clínico-laboratorial dos casos suspeitos de dengue e Zika. Essa rotina foi realizada de forma contínua durante os anos de seguimento da coorte selecionada. Sendo assim, esse estudo permitiu novas evidências sobre os aspectos clínicos e epidemiológicos dessas doenças.

A presente tese é parte integrante da linha de pesquisa em dengue do IPTSP/UFG e apresenta os resultados das avaliações clínico-laboratoriais da coorte no município de Goiânia.

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1 DOENÇAS INFECCIOSAS

Transformações sociais, econômicas e demográficas como a ampliação da cobertura do saneamento básico, a melhoria das condições habitacionais e a introdução de novas tecnologias de saúde, particularmente vacinas e antibióticos ocorridas nos últimos 50 anos foram decisivas para o rápido declínio da magnitude das doenças infecciosas no mundo. Mesmo assim, esse grupo de doenças não perdeu sua relevância em saúde pública ao longo do tempo, sendo ainda uma prioridade na Agenda Global de Saúde Pública (WALDMAN; SATO, 2016).

Nesse contexto, no Brasil, as endemias rurais como a esquistossomose mansônica, a doença de Chagas e a malária; as doenças diarreicas agudas (DDA); e as doenças imunopreveníveis como o sarampo, a poliomielite, a rubéola apresentaram tendência de declínio. Todavia, a reemergência de doenças infecciosas agudas como a febre amarela, a dengue e mesmo o sarampo foram relatadas, assim como a emergência de novos arbovírus: o chikungunya (CHIKV) e o Zika (ZIKV) e de novos subtipos do vírus influenza A (WALDMAN; SATO, 2016; BRASIL, 2019).

Apesar da redução da incidência e da mortalidade por doenças infecciosas ocorrida nos últimos anos, estima-se que elas ainda são responsáveis por aproximadamente 25,5% das 58,8 milhões de mortes anuais no mundo (WHO, 2013).

Dentre elas, as duas principais causas de óbitos são as infecções respiratórias agudas (IRAS) e as gastroenterites ou DDA (FAUCI; MORENS, 2012; WHO, 2013). Estima-se que as duas são responsáveis por 40% de todas as mortes em crianças no mundo anualmente, sendo 29% em menores de cinco anos, principalmente naquelas que vivem em regiões remotas e pobres. A carga que essas doenças impõem às famílias e aos sistemas de saúde de países de baixa renda exacerbam as desigualdades existentes (WHO, 2009a; WHO, 2013). Mesmo que 80% das mortes de crianças no mundo devido às IRAS e DDA ocorram em países da África e da Ásia (WHO, 2013), elas ainda têm sido descritas como importantes causas de morbimortalidade infantil no Brasil (PEDRAZA; QUEIROZ; SALES, 2014; SILVA FILHO, *et al.* 2017).

As arboviroses representam na atualidade 30% das doenças infecciosas agudas no mundo e constituem grave problema de saúde pública em países tropicais (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017).

1.2 DENGUE

A dengue é considerada, na atualidade, a mais importante arbovirose no mundo devido seus impactos na morbidade, mortalidade e economia dos países (SIMMONS *et al.*, 2012).

1.2.1 Etiologia e patogenia

A dengue é causada por um ácido ribonucleico (RNA) vírus (DENV), arbovírus, do gênero Flavivírus, da família *Flaviviridae*, que se divide genotipicamente em quatro sorotipos: DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4, possuindo diferenças antigênicas entre genótipos de um mesmo sorotipo (SIMMONS *et al.*, 2012). Em 2013, foi anunciada a descoberta do DENV5, detectado durante a triagem de amostras virais de um agricultor de 37 anos admitido em hospital na Malásia em 2007. A princípio, foi pensado que era um caso ordinário de dengue silvestre causada pelo DENV4 que circulava entre primatas nas florestas do Sudeste Asiático. No entanto, quando o vírus foi isolado e uma sequência genética completa foi realizada, observou-se que o vírus era filogeneticamente distinto das três formas anteriores de DENV4 silvestre e apresentava alguma semelhança com o DENV2. Este novo sorotipo segue o ciclo silvestre, diferentemente dos outros quatro sorotipos que seguem o ciclo no humano (NORMILE, 2013; MUSTAFA *et al.*, 2015). No entanto, alguns pesquisadores afirmaram que a ratificação oficial desse novo sorotipo aguarda a recuperação de um isolado, que deve ser caracterizado pela realização de uma série de rigorosos testes de identificação que confirmem, de fato, sua singularidade (TAYLOR-ROBINSON, 2016).

Não existe uniformidade na classificação dos vírus DENV em grupos genéticos, ou genótipos, como ocorre com a classificação do vírus em sorotipos, apesar de existir uma tentativa de uniformizá-la. Segundo as classificações mais aceitas, existem quatro a seis genótipos reconhecidos para cada sorotipo do DENV (CHEN; VASILAKIS, 2011; YAMASHITA *et al.*, 2013). Para o sorotipo 1, são cinco genótipos (I-V), sendo que o V é que circula no Brasil (GONCALVEZ *et al.*, 2002; CARNEIRO *et al.*, 2012). Para o sorotipo 2, seis genótipos estão descritos: asiático I, asiático II, sudeste asiático/americano, cosmopolita, silvestre e americano, sendo o asiático-americano o que circula no Brasil (TWIDDY *et al.*, 2002; AÑEZ; MORALES-BETOULLE; RIOS, 2011; BONA; TWERDOCHLIB; NAVARRO-SILVA, 2012, JESUS *et al.*, 2019). Para o sorotipo 3, há cinco genótipos (I-V), sendo o III o que circula no Brasil (LANCIOTTI *et*

al., 1994; WITTKÉ *et al.*, 2002; ARAÚJO *et al.*, 2012). Duas classificações foram propostas para o sorotipo 4: a primeira descreve quatro genótipos (I, II, III e IV) e a segunda cinco genótipos (I, IIA, IIB, III e silvestre). Em 2010, foi identificado o genótipo II, e em 2012, o genótipo III circulando no Brasil (ABUBAKAR; WONG; CHAN, 2002; TEMPORÃO *et al.*, 2011; NUNES *et al.*, 2012).

Do ponto de vista epidemiológico, os DENV podem apresentar baixo, médio ou alto impacto ou seja, alguns vírus podem permanecer num ciclo silvestre de baixa transmissibilidade nos seres humanos, outros produzem quadros menos graves (ex: genótipo americano do DENV2) e alguns genótipos (ex: sudeste asiático do DENV2) estão associados ao potencial de causar dengue grave (COLOGNA; ARMSTRONG; RICO-HESSE, 2005). As análises filogenéticas e epidemiológicas sugerem que os genótipos mais virulentos foram substituindo aqueles de menor impacto epidemiológico (RICO-HESSE, 2003).

A suscetibilidade ao vírus é universal. A infecção por um dos sorotipos gera imunidade permanente para este, além de induzir imunidade transitória de algumas semanas contra a reinfecção aos demais (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009). Todavia, foi publicada uma pesquisa realizada no Peru que indicou a possibilidade de haver reinfecção por um mesmo sorotipo devido uma proteção homóloga incompleta contra o DENV (FORSHEY *et al.*, 2016).

A fisiopatogenia da resposta imunológica ao quadro agudo de dengue pode ser primária ou secundária. Nas pessoas não expostas ao vírus anteriormente acontece a resposta primária, em que o título de anticorpos se eleva lentamente. O nível de anticorpos aumenta rapidamente na resposta secundária, indicando infecção prévia por qualquer um dos sorotipos virais (BRASIL, 2014).

Após a picada de um mosquito infectado, o vírus entra em contato com monócitos circulantes e células dendríticas, replica-se nos linfonodos regionais e se dissemina por meio dos sistemas linfático e sanguíneo para outros tecidos. Na viremia há estimulação da produção de anticorpos específicos e resposta celular contra o patógeno. Todos os quatro sorotipos evidenciam tropismo principalmente para monócitos, macrófagos e células dendríticas (SENEVIRATNE; MALAVIGE; DE SILVA, 2006; VERHAGEN; GROOT, 2014).

Acredita-se que os monócitos e as células dendríticas infectadas produzam quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias que, juntamente com as células T ativadas, causem disfunção endotelial com conseqüente aumento da permeabilidade vascular,

favorecendo a eclosão dos derrames cavitários. Anticorpos produzidos na primoinfecção podem não neutralizar um sorotipo viral diferente e, além disso, podem, paradoxalmente, amplificar a infecção, facilitando a entrada em macrófagos. Os vírus, para tanto, fazem uso dos receptores de membrana Fc gama ($Fc\gamma$). O estímulo causado pela liberação de interferon gama ($IFN-\gamma$) por células da resposta T *helper* 1 (Th1) ativadas agrava este quadro porque eleva a exposição de $IFN-\gamma$ na membrana dos macrófagos tornando-os mais susceptíveis ao vírus (LOBO *et al.*, 2014). As citocinas e a função citolítica das células T de memória estimuladas por peptídeos variantes, representando sorotipos heterólogos, afetam a habilidade do hospedeiro infectado de controlar a replicação viral (GUZMAN; HARRIS, 2015).

Além disso, títulos de anticorpos específicos para o sorotipo do vírus que causou a infecção primária aumentam substancialmente durante a infecção secundária. Estes anticorpos sub-neutralizantes se ligam aos vírus da segunda infecção e aceleram a taxa de entrada e infecção nas células hospedeiras. Este aumento de infectividade anticorpo-dependente fornece uma possível explicação para o fato de que pacientes com infecção secundária apresentarem elevado risco de desenvolver dengue grave (HALSTEAD, 1988; SIMMONS *et al.*, 2012).

Todavia, outros mecanismos para o desenvolvimento de dengue grave têm sido propostos como: anticorpos contra o vírus ou complexos antígeno-anticorpo podem ativar a cascata do complemento e esta ativação se relaciona temporariamente ao extravasamento plasmático; alguns anticorpos específicos contra o vírus podem apresentar reação cruzada com proteínas do hospedeiro, o que pode ativar a cascata da coagulação e alterar a função endotelial; estudos de caso-controle de associação de genes evidenciaram uma predisposição genética do hospedeiro para dengue grave; e árvores evolucionárias do DENV indicam que genótipos virais específicos dentro de um sorotipo estão associados a maior ou menor gravidade da doença (VERHAGEN; GROOT, 2014).

1.2.2 Vetor, ciclo biológico e transmissão

A dengue está presente em países tropicais e subtropicais e é transmitida ao homem por meio da picada de vetores hematófagos encontrados principalmente em áreas urbanas e semi-urbanas (MEDRONHO, 2006), sendo o *Aedes aegypti* o mais eficiente na transmissão da doença, apesar da recente ampliação da área geográfica de um vetor secundário (*Aedes albopictus*) da Ásia para a África, Américas e Europa (WHO, 2009b).

O *Aedes aegypti* tem cor escura, com patas e corpo rajados de branco e vive, em média, 30 a 35 dias. A fêmea deposita ovos em locais de água parada e preferencialmente limpa, sendo que um ovo pode se manter viável por até 450 dias (SILVA; SILVA, 1999; TAUIL, 2002).

A transmissão do DENV acontece por meio da picada da fêmea do vetor no ciclo ser humano – *Aedes aegypti* – ser humano, em que dois ciclos estão presentes: um que ocorre no ser humano (intrínseco) e outro que ocorre no mosquito (extrínseco). Após um repasto de sangue infectado, o vírus vai se localizar nas glândulas salivares da fêmea, podendo o mosquito transmiti-lo depois de oito a 12 dias de incubação (BESERRA; CASTRO JÚNIOR, 2008; RIVERA; RODRÍGUEZ, 2010).

O vetor tem um ciclo reprodutivo sensível às variações de temperatura, o que se relaciona à influência sazonal da doença nos meses mais quentes e úmidos. No Brasil, apesar da incidência de casos diminuir quando a temperatura cai na segunda metade do ano, não há interrupção da cadeia de transmissão (MEDEIROS *et al.*, 2011). O período de incubação da dengue varia de quatro a 10 dias (média de cinco a seis dias) e o período de transmissibilidade intrínseco coincide com o período de viremia (um dia antes do aparecimento da febre até o quinto dia da doença) (BRASIL, 2019).

Outras vias de transmissão não vetorial são raras, mas foram relatadas na literatura envolvendo a exposição mucocutânea, acidentes de laboratório, transfusão de sangue, transplante de medula óssea, transplante de órgãos, transmissão intraparto e perinatal. A possibilidade de transmissão por meio da amamentação também foi levantada (ARRAGAIN *et al.*, 2017; CHEN; WILSON, 2016).

1.2.3 Características clínicas

O espectro clínico da doença varia de infecção assintomática (75% dos casos), oligossintomática até dengue grave com risco de morte. Três fases clínicas podem ocorrer. A primeira é a fase febril. Nesta, a febre tem início abrupto, é geralmente alta, com duração de dois a sete dias, podendo ser acompanhada de cefaleia, dor retroorbitária, mialgias, artralgias, adinamia, náuseas, vômitos, diarreia pastosa não volumosa e exantema maculo-papular, pruriginoso ou não, presente em 50% dos casos (SIMMONS *et al.*, 2012; BRASIL, 2016, 2019).

Grande parte dos pacientes recupera-se gradativamente com melhora do estado geral. Alguns pacientes podem apresentar a segunda fase conhecida como crítica, entre o

terceiro e sétimo dia da doença, onde ocorrem o declínio da febre e sinais de alarme resultantes do aumento da permeabilidade vascular, como dor abdominal intensa e contínua, vômitos persistentes, acúmulo de líquidos no terceiro espaço/cavidades (ascite, derrames pleural e/ou pericárdico), hipotensão postural e/ou lipotímia, hepatomegalia, sangramento de mucosa, letargia e/ou irritabilidade e aumento progressivo do hematócrito. Nesta fase pode ocorrer a dengue grave com: desconforto respiratório por síndrome da angústia respiratória, pneumonites ou sobrecargas de volume; sangramento grave (hemorragia maciça sem choque prolongado); ou sinais de disfunção orgânica afetando o coração, os pulmões, os rins, o fígado e o sistema nervoso central. O choque de rápida instalação e curta duração pode ocorrer em geral entre o quarto e quinto dia da doença, sendo precedido pelos sinais de alarme citados (GUILARDE *et al.*, 2008; SIMMONS *et al.*, 2012; BRASIL, 2016, 2019).

Sabe-se que os pacientes com evolução desfavorável apresentam uma síndrome de extravasamento vascular sistêmica e transitória (24 a 72 h) presente na fase de defervescência, evidenciada por hemoconcentração, hipoproteinemia e derrames cavitários, podendo apresentar, além de manifestações hemorrágicas, sinais de colapso vascular periférico, choque e óbito. Tal possibilidade contribui para a elevada carga que a doença acarreta aos sistemas de saúde dos países afetados (SIMMONS *et al.*, 2012).

A terceira fase ou fase de recuperação se dá nos pacientes que passaram pela fase crítica, havendo reabsorção gradual do conteúdo extravazado com progressiva melhora clínica. Há a normalização do débito urinário e, nessa fase, pode surgir rash cutâneo com ou sem prurido (SIMMONS *et al.*, 2012; BRASIL, 2016).

Enquanto a maior parte das infecções pelo DENV permanece assintomática, uma pequena parcela de pacientes sintomáticos apresenta doença grave. Idade precoce, sexo feminino, índice de massa corporal elevado, fatores da cepa viral, variantes genéticas humanas e reinfeção por diferentes sorotipos foram considerados fatores de risco para dengue grave em estudos epidemiológicos (BURKE *et al.*, 1988; HALSTEAD, 1988; RICO-HESSE *et al.*, 1997; HUNG *et al.*, 2005; ANDERS *et al.*, 2011; KHOR *et al.*, 2012). Lactentes, pré-escolares e escolares com dengue grave apresentam letalidade mais elevada do que adolescentes e adultos (HARRIS *et al.*, 2000; GUZMÁN *et al.*, 2002).

1.2.4 Investigação laboratorial

A investigação laboratorial ocorre por meio de exames inespecíficos e específicos. Aumento do hematócrito, redução de plaquetas, elevação das transaminases e diminuição da albumina são as alterações mais importantes a se pesquisar nos exames inespecíficos para diagnóstico e acompanhamento dos pacientes suspeitos de dengue. Nos pacientes em que não se detecta sinais de alarme, nem comorbidades, o hemograma pode ser solicitado a critério médico. Naqueles com presença de sangramento espontâneo ou induzido pela prova do laço, ou de condições clínicas especiais/comorbidades como menores de dois anos, gestantes, maiores de 65 anos, doenças crônicas associadas, doença ácido péptica, hepatopatias e doenças autoimunes, a solicitação do hemograma é obrigatória. Nos doentes que apresentarem algum sinal de alarme ou sinais de choque, sangramento grave ou disfunção grave de órgãos, o hemograma, as transaminases e a albumina sérica devem ser solicitados o mais breve possível (BRASIL, 2016).

O diagnóstico específico é feito por meio de métodos diretos: pesquisa de isolamento viral, pesquisa de genoma do DENV por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e pesquisa de antígeno NS1; e métodos indiretos: pesquisa de anticorpos IgM por testes sorológicos (ELISA), teste de neutralização por redução de placas (PRNT), inibição da hemaglutinação e estudo anatomopatológico seguido de pesquisa de antígenos virais por imunohistoquímica. A pesquisa de IgM deve ser feita após o quinto dia do início dos sintomas. O isolamento viral, RT-PCR, NS1 e estudo anatomopatológico seguido de pesquisa de antígenos virais devem ser realizados até o quinto do início dos sintomas (SIMMONS *et al.*, 2012; BRASIL, 2014, 2016, 2019).

Os anticorpos IgM anti-dengue desenvolvem-se rapidamente, em geral a partir do quinto dia do início dos sintomas, atingindo níveis mais elevados por volta do sétimo ou oitavo dia, podendo ser detectados por até 90 dias. Os níveis desse anticorpos são mais baixos em infecções secundárias, sendo possível, durante essa fase, a presença de reações anti-IgM falso-negativas (FIGUEIREDO, 1999; GUZMÁN; KOURÍ, 2004; BRASIL, 2014, 2016, 2019).

Os anticorpos IgG específicos são observados a partir do quarto dia após o início dos sintomas, em níveis baixos, elevam-se gradualmente, atingem níveis mais altos em duas semanas e mantêm-se detectáveis por vários anos, conferindo imunidade contra o tipo infectante, provavelmente por toda a vida. Em infecções secundárias, os níveis de

IgG se elevam rapidamente já no início dos primeiros sintomas (FIGUEIREDO, 1999; GUZMÁN; KOURÍ, 2004; BRASIL, 2014, 2016).

Os testes sorológicos, no Brasil, são os métodos de escolha para a confirmação laboratorial na rotina, pois têm fácil reprodutibilidade, possuem especificidade e sensibilidade razoáveis e o resultado pode ser obtido em poucas horas. Existem várias técnicas e dentre elas, a captura de IgM por ELISA é o mais comumente usado, pois detecta infecções atuais ou recentes, além de fornecer, sobretudo quando solicitado após o sexto dia do início dos sintomas, resultado presuntivo com uma única amostra de soro. É um ensaio baseado na captura de anticorpos IgM humana em uma placa de microtitulação, usando esses anticorpos seguido pela adição do antígeno viral específico (sorotipos 1 a 4) derivados da proteína do invólucro do vírus. O ELISA IgG usado para a detecção de uma infecção progressiva de dengue faz uso dos mesmos antígenos virais do ELISA IgM (GUZMÁN; KOURÍ, 1996; BHAT *et al.*, 2015; BRASIL, 2016, 2019; CDC, 2016). Em razão da semelhança entre alguns sinais e sintomas de dengue, chikungunya e Zika, recomenda-se, em caso de a suspeita principal ser dengue, que a testagem seja iniciada, quando possível, por métodos diretos e posteriormente indiretos. As amostras negativas e/ou não reagentes aos métodos empregados deverão ser testadas para Zika e posteriormente para chikungunya. Em cenários de cocirculação dessas arboviroses, faz-se necessária a investigação por métodos diretos para detecção desses vírus. Em relação ao diagnóstico sorológico, existe a possibilidade de reação cruzada da IgM entre o DENV e o ZIKV. Dessa forma, recomenda-se que as amostras sejam testadas em paralelo para as duas doenças (BRASIL, 2019).

A detecção da NS1 do genoma viral tem sido ferramenta útil para o diagnóstico de infecções agudas de dengue (SHU *et al.*, 2003). O antígeno NS1 pode ser detectado precocemente no soro dos pacientes infectados (um dia após o início dos sintomas). Apresenta sensibilidade entre 70 e 90% e especificidade maior que 90% durante os primeiros dias da febre, sendo encontrado tanto na infecção primária, quanto na secundária (LIMA *et al.*, 2010, 2011). Importante salientar que resultados negativos não afastam a possibilidade de dengue. Está disponível em duas metodologias: NS1 teste rápido (imunocromatográfico) e NS1 ELISA (GUZMAN *et al.*, 2010; BHAT *et al.*, 2015; BRASIL, 2016). A sensibilidade do NS1 ELISA foi de 85,6 a 95,9%, enquanto a sensibilidade do NS1 teste rápido foi 71,9 a 79,1%, em estudo que utilizou amostras séricas retrospectivas de pesquisas anteriores que abordaram as causas e a vigilância de doenças febris agudas no Peru, Equador e Honduras. Ainda nesse estudo, a sensibilidade

de ambos foi menor durante a investigação de infecções secundárias (PAL *et al.*, 2014). Embora tenha sido descrito que a detecção do antígeno NS1 do DENV não apresenta reação cruzada com o ZIKV (MUSSO; GUBLER, 2016; VAN MEER *et al.*, 2017; MATHEUS *et al.*, 2016), Gyurech *et al.* (2016) relataram um teste do antígeno NS1 falso positivo para dengue em um paciente com infecção aguda pelo ZIKV.

O isolamento viral é o método mais específico (padrão ouro) e permite a identificação do sorotipo responsável pela infecção utilizando-se a técnica de imunofluorescência (IF) indireta, aplicando-se anticorpos monoclonais específicos para cada sorotipo. Pode ser realizado em amostras de sangue, líquido e fragmentos de vísceras. A amostra deve ser coletada durante o período de viremia (BRASIL, 2014, 2016; BHAT *et al.*, 2015).

A detecção do genoma viral pelo método da RT-PCR não é usada na rotina diagnóstica, mas é importante para o diagnóstico dos casos em que as técnicas de rotina não foram suficientes para a definição diagnóstica, sobretudo nos casos que evoluíram para o óbito (SHU *et al.*, 2003). O método pode, também, ser realizado em amostras de sangue, líquido e fragmentos de vísceras, bem como em lotes de mosquitos vetores. As elevadas sensibilidade e especificidade e a detecção de quantidades mínimas de material genético em amostras de paciente a fazem um método para diagnóstico precoce de infecção pelo DENV (BRASIL, 2014, 2016; BHAT *et al.*, 2015). Pode-se também usar a reação de transcrição reversa da cadeia de polimerase em tempo real (real time RT-PCR). Este método permite, a partir da titulação do vírus, quantificar o RNA viral em aproximadamente uma hora e 30 minutos, usando pares de primers e sondas que são específicas para cada sorotipo (CHAO; DAVIS; CHANG, 2007).

O diagnóstico histopatológico seguido de pesquisa de antígenos virais por imunohistoquímica é realizado em material (fígado, baço, coração, linfonodos, rins e cérebro) obtido após o óbito do paciente. O diagnóstico é presuntivo. A imunohistoquímica (IHQ) permite a detecção de antígenos virais em cortes de tecidos fixados em formalina emblocados em parafina, corados pela fosfatase alcalina ou peroxidase marcada com anticorpo específico. Essa técnica é bastante sensível e específica, devendo ser utilizada após o diagnóstico histológico presuntivo (GUZMÁN; KOURÍ, 2004; BRASIL, 2014, 2016; BHAT *et al.*, 2015).

1.2.5 Dengue na infância e adolescência: algumas especificidades

A dengue emergiu como um crescente problema de saúde pública nos últimos 50 anos, particularmente no Sudeste Asiático, nas Américas Central e do Sul e na África (BRADY *et al.*, 2012). A maioria dos casos no mundo aconteceu em pessoas com menos de 15 anos (BHATTACHARYA *et al.*, 2013). A doença é responsável por significativa morbi-mortalidade em crianças que vivem ou visitam parentes ou amigos nestas regiões (VERHAGEN; GROOT, 2014).

Em crianças, além de existir imunidade permanente após infecção por determinado sorotipo, há uma imunidade heterotípica transitória pelos anticorpos maternos até sete a oito meses após o nascimento (CARROLL; TOOVEY; VAN GOMPEL, 2007). Bebês nascidos de mães com imunidade estabelecida para o DENV são um grupo especial de alto risco para a dengue grave e hospitalização durante a infecção primária no primeiro ano de vida (HARRIS *et al.*, 1999; JESSIE *et al.*, 2004). Assim como nos adultos, episódios de dengue grave na infância são mais frequentes durante a infecção secundária (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009).

A doença pode resultar da infecção por qualquer um dos quatro sorotipos e o quadro clínico pode variar de uma síndrome febril clássica viral leve, com sinais e sintomas inespecíficos (adinamia, sonolência, hiporexia, vômitos e diarreia) à síndrome do choque da dengue potencialmente fatal (BRASIL, 2016). Ainda que a febre alta frequentemente esteja presente nas crianças com dengue, elas habitualmente são menos sintomáticas do que os adultos na fase febril da doença (VERHAGEN; GROOT, 2014). O quadro grave nas crianças pode ser identificado como a primeira manifestação clínica, sendo mais súbito do que nos adultos, nos quais os sinais de alarme são mais facilmente observados (SIMMONS *et al.*, 2012; BRASIL, 2016). Extravasamento plasmático e choque são mais frequentes e graves na infância, enquanto manifestações hemorrágicas e disfunção orgânica são mais frequentes em adultos (VERHAGEN; GROOT, 2014). Hemorragia clinicamente significativa na fase crítica da doença em crianças geralmente ocorre associada a choque profundo e prolongado (SIMMONS *et al.*, 2012).

O risco de dengue com sinais de alerta e dengue grave varia com a idade, sendo os quadros graves mais frequentes em lactentes e pré-escolares/escolares quando comparados a adolescentes e adultos. Além disso, sabe-se que a letalidade nas crianças mais jovens com dengue grave é mais elevada do que nos adultos (HAMMOND *et al.*, 2005).

Em crianças/adolescentes, a investigação laboratorial é realizada com os mesmos exames dos adultos e o manejo clínico segue os mesmos princípios terapêuticos já descritos para os doentes mais velhos (SIMMONS *et al.*, 2012; VERHAGEN; GROOT, 2014; BRASIL, 2016).

1.2.6 Aspectos epidemiológicos

Em relação aos aspectos epidemiológicos, a dengue é a doença viral transmitida por mosquito que se espalha mais rapidamente no mundo (GUZMAN; HARRIS, 2015) e representa grande preocupação internacional de saúde pública (PEREZ *et al.*, 2019). Ela é endêmica em mais de 100 países no Sudeste da Ásia, Américas, Pacífico Ocidental, África e regiões do Mediterrâneo Oriental (GUZMAN; HARRIS, 2015). Estima-se que em torno de dois bilhões e 500 milhões de pessoas vivam em países onde a dengue é endêmica (STANAWAY *et al.*, 2016). Acredita-se que há, por ano, em torno de 390 milhões de infecções, 96 milhões de casos sintomáticos, com 500 mil hospitalizações e 20 mil óbitos (SHEPARD *et al.*, 2004; WHO, 2012; BHATT *et al.*, 2013). Houve nos últimos 50 anos um acréscimo de 30% na incidência da doença, com aumento em sua transmissão em países da África, Ásia, Américas e Europa, o que a tornou uma pandemia (WHO, 2012; GUZMAN; HARRIS, 2015).

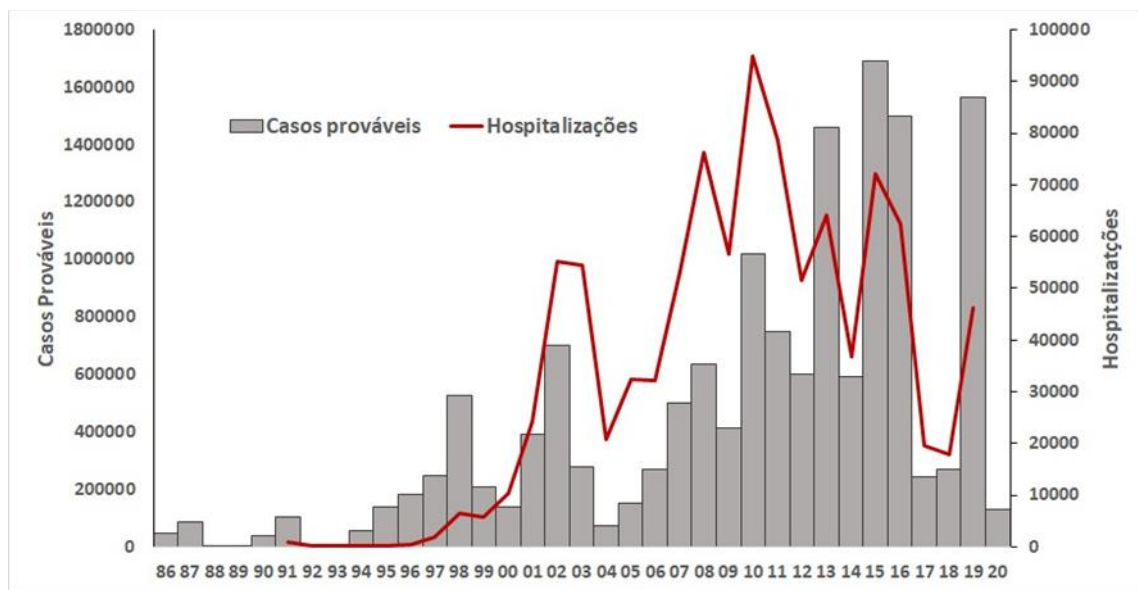
O impacto econômico da dengue nas Américas é estimado, em média, em 2,1 bilhões de dólares por ano (SHEPARD *et al.*, 2011). Os países das Américas, por suas características ambientais e socioeconômicas, apresentam elevada vulnerabilidade para a transmissão de dengue (GUBLER, 2011; COELHO, 2012). Todavia, entre as décadas de 1950 e 1960, esses países estiveram livres da presença da doença devido uma campanha continental de erradicação do *Aedes aegypti* promovida pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) (SCHNEIDER; DROLL, 2001). Porém, mesmo havendo rápido crescimento populacional e acelerada urbanização descontrolada, os esforços de controle do vetor não foram mantidos. Houve então a reinfestação do vetor e a reemergência da doença, que ocorreu nas Américas nas décadas de 1960 e 1970. Já os primeiros casos de febre hemorrágica do dengue (FHD) surgiram na década de 1980 (WILSON; CHEN, 2002; GUZMAN; KOURI, 2003). Houve tendência crescente na incidência da doença nos últimos 30 anos, incluindo as formas graves e óbitos, sendo notificados 343.771 casos graves e 57.665 óbitos, com pelo menos 80% deles ocorrendo nos últimos dez anos. Apesar dos quadros graves ocorrerem na maior parte dos países da

região, pelo menos 90% aconteceram no México, Colômbia, Brasil, Venezuela e Honduras (SAN MARTÍN *et al.*, 2010; OPAS, 2013). A tendência crescente dentro das Américas continuou nos últimos anos, com casos de dengue registrados, aumentando de 857.534 casos em 2008 para 2,3 milhões durante 2016, sendo notificadas 1.032 mortes relacionadas à dengue. Todavia, houve redução desse número, chegando a 580.640 casos notificados em 2017, com 317 óbitos e 561.351 em 2018, com 340 óbitos (PAHO, 2017). Até novembro de 2019, 2.733.635 casos foram notificados, com 1.206 óbitos (PAHO, 2019).

Durante aproximadamente 60 anos (1923 a 1980) não houve registros de casos de dengue no território brasileiro (TAUIL, 2001). Em 1981/82, houve a primeira epidemia de dengue documentada no Brasil (OSANAI, 1984). A doença passou a ocorrer de forma endêmica desde 1986, com a introdução do DENV1. Os casos da doença, que inicialmente foram observados em grandes centros urbanos, passaram a ser registrados em todas as regiões ao longo das duas décadas seguintes, afetando municípios de todos os portes populacionais. Entre janeiro de 2000 e dezembro de 2018, foram registrados mais de 11 milhões e 500 mil casos prováveis da doença no país, com a ocorrência de picos de transmissão nos anos de 2002, 2008, 2010, 2013, 2015 e 2016 (Figura 1). Nesse período, também foram registrados 116 mil casos graves e cinco mil óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018a).

O padrão clínico inicial observado foi de ocorrência de casos de dengue clássica afetando adultos jovens. Com a introdução do DENV2 em 1990, foram observados casos de FHD, ainda em adultos, mas com uma frequência baixa de ocorrência durante toda essa década (TEIXEIRA *et al.*, 2013). Com a introdução do DENV3, em 2002, houve um aumento no número de casos graves e hospitalização pela doença, sinalizando um novo cenário epidemiológico da doença (Figura 1).

Figura 1. Casos prováveis e hospitalizações por dengue. Brasil, 1986-2019



Fonte: Sinan/SVS/MS e SIH/SUS/MS. *Dados atualizados em outubro de 2019.

Essa tendência de aumento na transmissão e na ocorrência de casos graves se manteve durante toda a década de 2000, com a migração de casos graves para crianças durante um novo ciclo de transmissão do DENV2, entre os anos de 2007 e 2009, ocorrendo mais de 25% dos óbitos em crianças. Em 2007, aproximadamente 41% das hospitalizações relacionadas à doença ocorreram em crianças com idade inferior a 15 anos (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

A partir de 2010, um novo ciclo de transmissão do DENV1 foi observado, com um aumento no número de casos graves entre a população com idade superior a 60 anos. Esse padrão se manteve durante o ano de 2013, quando foi observada uma marcante epidemia de dengue no país (DENV1/4), com mais de 1,4 milhão de casos prováveis. Em 2015 e 2016, houve aumento da incidência em todas as faixas etárias, no entanto, foi observado um aumento do número de casos novos entre adolescentes e adultos jovens. Todavia um grupo de experts sugeriu que essa elevação da incidência em 2016 fosse analisada com cautela devido à possibilidade de casos de chikungunya e de Zika terem sido classificados erroneamente como dengue (PEREZ *et al.*, 2019).

Em 2017 e 2018, houve acentuada redução dos casos notificados de dengue nas Américas. Entre 2016 e 2017, no Brasil, o número de casos de dengue caiu de 1.500.535 para 252.054, o que representou uma redução de 83%, além de ocorrer a presença de DENV 2 em diversos estados. Foram levantadas as hipóteses de que a imunidade cruzada entre a infecção por dengue e Zika e o aumento das atividades de controle do vetor podem

ter tido o maior peso na redução do número de casos da dengue nesses locais (PEREZ *et al.*, 2019). Em 2019, o número aumentou para 1.527.119 casos notificados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

No estado de Goiás, a dengue foi registrada laboratorialmente em 1994 a partir da introdução do DENV1, quando ocorreu a primeira epidemia da doença na região. Houve notificação de aproximadamente 3.500 casos de dengue clássico, sendo 98% dos casos registrados em Goiânia (MACIEL, 1999). O DENV1 permaneceu como o único sorotipo detectado até 1997, ocasião em que foi isolado o DENV2 (FERES *et al.*, 2006). Casos de dengue grave foram registrados a partir da introdução desse sorotipo, o que foi concordante com os dados relatados no Brasil que associaram casos com maior gravidade à infecção por este sorotipo quatro anos depois da primeira epidemia por DENV1 (NOGUEIRA *et al.*, 1991; ZAGNE *et al.*, 1994).

A dengue tornou-se endêmica na região, com picos epidêmicos nos meses de janeiro a março, estabelecendo um padrão de sazonalidade no período das chuvas, tal como é observado em outras regiões do Brasil (SIQUEIRA *et al.*, 2004). Em janeiro de 2002, houve a introdução do DENV3 em Goiás, durante a epidemia ocorrida em Goiânia, apesar do DENV1 haver predominado em 90,8% dos isolados. O DENV3 dispersou-se rapidamente, sendo detectado simultaneamente em outros municípios do estado, tornando-se predominante com 78,2% dos isolados no ano de 2003, em substituição ao DENV1 (FERES *et al.*, 2006).

No período de 2003 a 2007, observou-se a intensificação da interiorização da dengue em Goiás associado ao aumento do número de casos notificados, de casos graves e óbitos no estado (MACIEL; SIQUEIRA JÚNIOR; MARTELLI, 2009). Em 2008, foram notificados em Goiás cerca de 70% do total de casos registrados no Centro-Oeste, mas em 2009 observou-se uma redução de 2% das notificações de dengue (n=50.087) neste estado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Ao longo de 2009, houve nova mudança no sorotipo predominante, com recirculação do DENV1, existindo nova epidemia em 2010. No ano de 2011, ocorreram os primeiros casos de dengue pelo DENV4 e em 2013 aconteceu uma grande epidemia de dengue no estado com quase 164 mil casos notificados e 65 óbitos confirmados (TEIXEIRA *et al.*, 2013). Nos anos de 2010 a 2014, o estado registrou 472.186 casos suspeitos de dengue com 367 óbitos. Em 2015 e 2016, foram notificados, respectivamente, 189.421 e 128.429 casos em Goiás (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014, 2018b; BRASIL, 2019). O número de casos notificados nesse estado reduziu para 63.484 em 2017 e 86.454 em 2018, havendo predomínio do DENV2 a partir

de 2017 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b). Em 2019, houve aumento do número de casos notificados para 150.694, mantendo o DENV2 (98,2%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

A dengue surgiu em Goiânia em 1994, com uma epidemia causada pelo DENV1. Em 1999, ocorreu a introdução do DENV2, em circulação concomitante ao DENV1, e foi detectado um aumento dos casos mais graves e do número de hospitalizações (SIQUEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2004). Em 2002, ocorreu a introdução do DENV3, que circulou como o sorotipo predominante até 2007 (FERES *et al.*, 2006).

A partir da década de 2000, foi observado um aumento da frequência da doença, com a ocorrência de grandes epidemias nos anos de 2002, 2008, 2009, 2010, 2013, 2015 e 2016, refletindo a alternância entre os sorotipos predominantes do DENV (GOIÂNIA, 2017). Em 2002, na epidemia em Goiânia, aproximadamente 17 mil casos e três óbitos foram registrados. Na epidemia de 2008, houve circulação do DENV 1, 2 e 3 e aumento considerável no número de casos graves. Foram notificados aproximadamente 23 mil casos suspeitos, 120 casos de FHD confirmados e 24 óbitos. Em 2009, houve epidemia novamente, com quase 30 mil casos e 22 óbitos. Em 2010, o número de casos notificados aumentou cerca de 50% em comparação a 2009, com registro de mais de 44 mil casos e 21 óbitos confirmados (GOIÂNIA, 2016).

Entre 2003 e 2018, em Goiânia, foram registrados aproximadamente 335 mil casos prováveis da doença. Em 2015, ocorreu a maior epidemia registrada até então e Goiânia esteve entre os municípios brasileiros com maior número de registro de casos prováveis (n=80.494), com incidência atingindo 5,49 mil casos por 100 mil habitantes, com a ocorrência de 38 óbitos. Nesse ano, houve circulação dos sorotipos DENV1 (80,9%), DENV4 (18,7%) e um caso de DENV2 (0,4%) (GOIÂNIA, 2016; 2017). Em 2016, houve também epidemia com registro de 62.920 casos suspeitos, incidência de 4,34 mil casos para cada 100 mil habitantes, com a ocorrência de 19 óbitos e presença dos sorotipos 1, 2 e 4. Assim como nas Américas, no Brasil e em Goiás, houve redução nos casos notificados (n=32.447 em 2017 e n=30.265 em 2018) e incidência (2,2 mil casos em 2017 e 2 mil casos em 2018 para cada 100 mil habitantes) de dengue em Goiânia, mas o número de óbitos devidos à doença (n=19 em 2017 e n=21 em 2018) foi semelhante ao de 2016. Os sorotipos presentes em 2017 e 2018 foram o 1, 2 e 4, ocorrendo o predomínio do 2 a partir de 2017 (GOIÂNIA, 2019b).

No período em que aconteceu o seguimento desse estudo, o total de casos prováveis de dengue registrados no município de Goiânia foi de 208.066, sendo que 66%

desse total foi registrado nos anos de 2015 e 2016. Uma marcada redução na circulação do DENV foi observada em 2017 e 2018, seguindo o mesmo padrão observado no Brasil como um todo. Em 2019, a circulação do DENV até o mês de abril foi superior aos dois anos anteriores. Até dezembro de 2019, foram notificados 35.528 casos suspeitos de dengue, com 14 óbitos (GOIÂNIA, 2019b).

O total de casos hospitalizados por suspeita clínica de dengue no município de Goiânia registrados no Sistema de Informações Hospitalares foi de 6.019 casos entre 2015 e março de 2019, dois quais 50% ocorreram no ano de 2015. Desde 2016, ocorreu uma redução no total de hospitalizações por dengue no município. Dos casos hospitalizados, em torno 15% foram registrados em menores de 15 anos de idade (GOIÂNIA, 2019a).

1.3 ZIKA

As infecções por ZIKV passaram a ser uma preocupação internacional devido seu potencial em causar microcefalia e outras anormalidades do desenvolvimento neurológico que ocorrem como consequência das infecções maternas (SIKKA *et al.*, 2016).

1.3.1 Vetor, transmissão, etiologia e aspectos virológicos

A Zika está presente em países tropicais e subtropicais e é transmitida ao homem por meio da picada do *Aedes aegypti*, o mais importante vetor envolvido na transmissão nas Américas. O *Aedes albopictus*, outro vetor capaz de transmitir a doença, está presente em latitudes tropicais e temperadas, mas não foi associado à transmissão da Zika nas Américas (MARCHETTE; GARCIA; RUDNICK, 1969; BRASIL, 2019).

O ZIKV pertence ao gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae* (KUNO *et al.*, 1998). Seu genoma é RNA, de fita simples, polaridade positiva e tamanho aproximado de 11 kilobases (BARONTI *et al.*, 2014). Foram mencionadas três linhagens do vírus: o da África do Leste, o da África do Oeste e o Asiático (LANCIOTTI *et al.*, 2008).

Em se tratando dos aspectos virológicos envolvidos na patogenia da Zika, o virion é a partícula viral infecciosa que possui: uma membrana lipídica externa na qual estão incorporados a proteína do envelope viral (E), uma proteína da membrana (M) e um nucleocapsídeo icosaédrico. Esse último é composto pela proteína capsídeo (C) e um genoma consistindo em uma única fita de RNA de sentido positivo que serve tanto como genoma quanto RNA mensageiro.

O virion se liga a um receptor na célula alvo da infecção através da proteína E e é trazido para a célula por um processo chamado endocitose mediada por clatrina, que faz com que o envelope seja removido, o nucleocapsídeo seja rompido e o genoma liberado no citoplasma. O genoma é traduzido pelo aparato de tradução da célula hospedeira em uma única poliproteína que é clivada proteoliticamente nas proteínas virais individuais: PreM, C e proteínas não estruturais NS1 a NS5. Algumas dessas proteínas formam a maquinaria de replicação do RNA, o que causa a produção de mais genomas usando a cópia de RNA de sentido negativo do genoma viral como um modelo. Os genomas são então reunidos em nucleocapsídeos por interação com a proteína capsidial e os nucleocapsídeos se tornam envolvidos durante o processo de brotamento que os libera da célula como virions infecciosos. A proteína E interage com receptores presentes no mosquito e em células de mamíferos, e usa sua maquinaria celular para entrar nas células, produzir proteínas virais e RNA, seguido pela geração de novos virions (SIKKA *et al.*, 2016).

Quando uma fêmea do vetor infectada se alimenta de sangue e injeta os virions na pele de um ser humano, ocorre a infecção de células na derme e epiderme (queratinócitos, fibroblastos e células dendríticas imaturas). O vírus então se espalha para os linfonodos, onde uma reação imunológica é iniciada ao mesmo tempo em que o vírus se replica e causa viremia (HAMEL *et al.*, 2015; GORSHKOV *et al.*, 2019; NOORBAKHSH *et al.*, 2019).

Outras vias de transmissão menos frequentes que a vetorial foram relatadas tais como contato sexual, exposição percutânea em acidentes de laboratório, transfusão de sangue e perinatal (CHEN; WILSON, 2016). Até o presente momento não se conhece o tempo de duração da imunidade conferida pela infecção natural do ZIKV (BRASIL, 2019).

1.3.2 Características clínicas

Os sintomas e sinais da infecção por ZIKV geralmente ocorrem três a 12 dias após a picada do mosquito vetor e desaparecem dentro de dois a sete dias. Embora a infecção assintomática seja comum, estudos recentes evidenciaram que mais de 50% dos humanos infectados com ZIKV tornam-se sintomáticos com o início agudo de erupção maculopapular, febre baixa ou mesmo ausente, conjuntivite não purulenta, artralgia, cefaleia, mialgia e prurido. A doença é geralmente leve e dura até uma semana

(BHARUCHA; BREUER, 2016; SIKKA *et al.*, 2016; BRASIL, 2019). Complicações como Síndrome de Guillain-Barré e meningoencefalite podem estar associadas à infecção pelo ZIKV (BRASIL, 2019; LIU *et al.*, 2017). A diferenciação clínico-laboratorial da dengue e Zika está descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Diferenciação dos sinais e sintomas e laboratorial descrita no Guia de Vigilância Epidemiológica, Brasil, 2019

Sinais / Sintomas / Exames	Dengue	Zika
Inespecíficos		
Febre (duração)	Alta (4 a 7 dias)	Baixa ou ausente (1 a 2 dias)
Rash cutâneo (frequência)	A partir 4º dia (30 a 50% dos casos)	1º ou 2º dia (90 a 100% dos casos)
Mialgia (frequência)	+++	++
Artralgia (frequência) (intensidade)	+ Leve	++ Leve/moderada
Edema articular	Raro	Frequente e de leve intensidade
Hiperemia conjuntival	Raro	50 a 90% casos
Cefaleia	++	+
Hipertrofia ganglionar	+	+++
Discrasia hemorrágica	++	Ausente
Risco de morte	+++	Raro (complicações neurológicas)
Acometimento neurológico	+	+++
Leucopenia	+++	+++
Linfopenia	Incomum	Incomum
Trombocitopenia	+++	+

Fonte: Ministério da Saúde, 2019.

1.3.3 Investigação laboratorial

Dependendo dos objetivos da investigação, o diagnóstico de infecção pelo ZIKV pode ser realizado por meio de:

- a) Isolamento viral: nos seres humanos, o vírus pode ser isolado em amostras de sangue, urina, saliva e sêmen.

b) Detecção de antígeno: a técnica de IHQ tem sido usada para detectar o antígeno do ZIKV em tecidos cerebrais e placentários de recém-nascidos congenitamente infectados com microcefalia e abortos espontâneos. Identificação da proteína NS3 por citometria de fluxo em sangue total, ensaio ELISA baseado em aptâmero para direcionamento da proteína NS1, ELISA competitivo baseado em proteína NS1, NS1 testes rápidos baseados em proteínas são exemplos de novos ensaios para detecção de antígenos do ZIKV.

c) Testes moleculares: A PCR é altamente sensível e específica e é conhecida como o “padrão ouro” para o diagnóstico do ZIKV, que deve ser realizada no soro na primeira semana após o início dos sintomas. Existem evidências sobre a vantagem da urina para detecção do RNA devido à longa duração da excreção viral nesse material facilmente coletável.

d) Testes sorológicos: A detecção de anticorpos (anti-ZIKV) pode ser realizada por diferentes testes sorológicos, incluindo fixação de complemento, inibição de hemaglutinação, ensaio de IF, ELISA e testes de neutralização. O anticorpo IgM anti-ZIKV se desenvolve na primeira semana após o início dos sintomas e é detectável do quinto ao décimo dia da doença. O anticorpo IgG anti-ZIKV aumenta poucos dias após a IgM e é rastreável por meses a anos (BHARUCHA; BREUER, 2016; SIKKA *et al.*, 2016; BRASIL, 2019; NOORBAKHS *et al.*, 2019).

Os resultados dos testes de detecção de IgM devem ser interpretados com cautela por causa da reatividade cruzada com outros vírus, tais como dengue e febre amarela. Caso necessário, resultados positivos ou ambíguos podem ser confirmados por testes sorológicos de neutralização por redução de placas (PRNT) (BRASIL, 2019).

1.3.4 Aspectos epidemiológicos

Sendo o primeiro caso de Zika registrado em seres humanos na Nigéria em 1954 (MACNAMARA, 1954), a presença do vírus se restringiu a um cinturão equatorial estreito de regiões da África e da Ásia (FAUCI; MORENS, 2016). Em 2007, epidemias ocorreram em ilhas do pacífico, com início em Yap, na Micronésia, quando, num período de três meses, aproximadamente três quartos da população foi infectada e um pouco mais de 12% foram sintomáticas (LANCIOTTI *et al.*, 2008). Em 2014, CAO-LORMEAU *et al.* (2014) registraram uma grande epidemia da doença eclodida em 2013 na Polinésia Francesa e a partir daí o ZIKV se disseminou para países da Oceania e, em 2014, chegou

às Américas, provavelmente na Ilha de Páscoa – Chile (TOGNARELLI *et al.*, 2016). No Brasil, a cepa emergente foi da linhagem asiática com características semelhantes à da Polinésia Francesa, sendo o primeiro caso reportado na região Nordeste em 2014 (Natal-RN) (ZANLUCA *et al.*, 2015). É possível que a introdução do ZIKV tenha ocorrido no ano de 2013, período em que ocorreu a Copa das Confederações (FARIA *et al.*, 2016). Em 2015, a presença do ZIKV foi identificada em diversos estados da região Nordeste (FANTINATO *et al.*, 2016). Em 2016, houve uma explosão de casos suspeitos notificados no Brasil, totalizando 216.207, sendo a maioria nas regiões Sudeste (n=92.937), Nordeste (n=75.338) e 34.173 Centro-Oeste (n=34.173) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b). Já em 2017, o número de casos suspeitos notificados no Brasil caiu significativamente para 17.593, sendo a maioria na região Centro-Oeste (n=6.258) e Nordeste (n=5.232) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b). Em 2018 houve queda em relação ao anterior, com 8.680 casos notificados com predomínio no Sudeste (n=3.149) e Nordeste (n=2.425). Até dezembro de 2019, houve notificação de 10.741 casos prováveis, com predomínio no Nordeste e Centro-Oeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Em Goiás, o primeiro caso autóctone confirmado de ZIKV foi no município de Santo Antônio do Descoberto em dezembro de 2015. Em 2016 foram notificados 10.477 casos suspeitos. Em 2017 esse número caiu para 3.947 casos e em 2018 para 988. Até dezembro de 2019, houve 1050 casos notificados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Em Goiânia, em 2015, houve 53 casos suspeitos de ZIKV notificados e a primeira confirmação aconteceu em dezembro do mesmo ano. Em 2016 ocorreu aumento importante do número de casos suspeitos (n=8.530), seguido de queda significativa nos anos seguintes: 2.771 casos em 2017 e 377 casos em 2018. Até dezembro, houve a notificação de 313 casos suspeitos em 2019 (GOIÂNIA, 2019b).

1.3.5 Zika e microcefalia

No segundo semestre de 2015, foi percebido um aumento do número de casos de microcefalia em Pernambuco - Brasil, sendo aventada a hipótese de que o quadro clínico dos recém-nascidos com microcefalia era sugestivo de infecção congênita e as mães dos mesmos relataram manifestações clínicas compatíveis com a infecção pelo ZIKAV (OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2016).

Estudo realizado por BESNARD *et al.* (2016) evidenciou casos de malformações neurológicas graves, incluindo microcefalia, relacionados ao período da epidemia de

ZIKV na Polinésia Francesa em 2013-14. Um estudo retrospectivo com dados da mesma epidemia reforçou a hipótese da associação do ZIKV e microcefalia, demonstrando que o risco de malformações foi maior no primeiro trimestre de gestação, período de formação do sistema nervoso (CAUCHEMEZ *et al.*, 2016).

Outras pesquisas fortaleceram ainda mais a hipótese de associação entre malformações fetais/microcefalia e infecção pelo ZIKV durante a gestação (BRASIL *et al.*, 2016; CAUCHEMEZ *et al.*, 2016). Em revisão publicada por Rasmussen *et al.* (2016), os pesquisadores concluíram que existia uma relação causal entre infecção pré-natal pelo vírus Zika e microcefalia e outras anomalias cerebrais graves.

Por fim, um estudo de caso-controle realizado em oito hospitais públicos de Recife-PE demonstrou que a epidemia de microcefalia era resultado da infecção congênita pelo ZIKV, existindo forte associação entre elas (ARAÚJO *et al.*, 2018).

1.4 VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DA DENGUE E ZIKA

O Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) foi implantado no Brasil em 1990 e a partir de 1998 tornou-se obrigatória a alimentação regular da base de dados nacional pelos municípios, estados e Distrito Federal. A coleta e o processamento dos casos notificados ocorrem em todo o território nacional, desde o nível local, utilizando dois formulários padronizados, a Ficha Individual de Notificação (FIN) e a Ficha Individual de Investigação (FII) que são digitadas nesse sistema. A FIN é preenchida para cada paciente e encaminhada pelas unidades assistenciais aos serviços responsáveis pela informação e/ou vigilância epidemiológica. A FII é utilizada como roteiro de investigação e seu preenchimento é feito pelos serviços municipais de vigilância ou unidades de saúde capacitadas para a realização da investigação epidemiológica. A coleta dos dados do sistema de vigilância da dengue é feita de forma passiva, com a notificação espontânea de dados ambulatoriais e hospitalares. A FII da dengue é o instrumento usado para se registrar os casos no Sinan (BRASIL, 2014).

Dentre os objetivos da vigilância da dengue e Zika no Brasil, alguns se destacam: a detecção precoce da ocorrência dos casos; o monitoramento de casos graves de dengue, de Zika em gestantes e casos de manifestações neurológicas possivelmente relacionados à infecção prévia por esses arbovírus; a redução da ocorrência de óbitos evitáveis mediante a identificação dos seus possíveis determinantes; e a definição de estratégias para aprimoramento da assistência aos casos (BRASIL, 2014, 2019).

Por ser uma doença de notificação compulsória, todo caso suspeito e/ou confirmado de dengue deve ser comunicado ao Serviço de Vigilância Epidemiológica o mais breve possível. Esse serviço, por sua vez, aciona a equipe de controle vetorial local para a adoção de medidas de combate ao vetor. O óbito suspeito por dengue é um evento de notificação imediata (BRASIL, 2014, 2019).

A partir de 2014, o país vem usando nova classificação para a definição de casos de dengue:

a) Caso suspeito é aquele em que a pessoa resida em área onde se registram casos de dengue, ou que tenha viajado nos últimos 14 dias para área com ocorrência de transmissão de dengue (ou presença do vetor). Deve apresentar febre, usualmente entre dois e sete dias, e duas ou mais manifestações: náuseas/vômitos, exantema, mialgia/artralgia, cefaleia/dor retro-orbital, petéquias, prova do laço positiva e leucopenia. Também pode ser considerado caso suspeito toda criança proveniente de (ou residente em) área de transmissão de dengue, com quadro febril agudo e sem foco de infecção aparente (WHO, 2009b; BRASIL, 2014, 2019).

b) Caso suspeito com sinais de alarme é todo caso de dengue que, no período de defervescência da febre, apresenta um ou mais dos seguintes sinais de alarme: dor abdominal intensa e contínua, vômitos persistentes, acúmulo de líquidos (ascite, derrames pleural e/ou pericárdico), hipotensão postural e/ou lipotímia, hepatomegalia, sangramento de mucosa ou outra hemorragia, letargia e/ou irritabilidade, queda abrupta de plaquetas e aumento progressivo do hematócrito (WHO, 2009b; BRASIL, 2014, 2019).

c) Caso suspeito de dengue grave é todo caso de dengue que apresenta um ou mais dos seguintes critérios: choque, sangramento grave e comprometimento grave de órgãos (fígado, sistema nervoso central, coração, dentre outros) (WHO, 2009b; BRASIL, 2014, 2019).

d) Caso confirmado é todo caso de dengue confirmado laboratorialmente por meio dos exames específicos (WHO, 2009b; BRASIL, 2014, 2019).

e) Óbito é todo paciente que cumpra os critérios da definição de caso suspeito ou confirmado que morreu como consequência de dengue (WHO, 2009b; BRASIL, 2014, 2019).

f) Caso descartado é todo caso suspeito de dengue que possui um ou mais dos seguintes critérios: diagnóstico laboratorial negativo (sorologia IgM), tenha diagnóstico laboratorial de outra entidade clínica, ou seja um caso sem exame laboratorial, cujas

investigações clínica e epidemiológica são compatíveis outras doenças (WHO, 2009b; BRASIL, 2014, 2019).

As definições de casos para Zika foram definidas pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2019):

a) Caso suspeito de Zika é o que apresente exantema maculopapular pruriginoso acompanhado de um ou mais dos seguintes sinais ou sintomas: febre baixa, hiperemia conjuntival sem secreção ou prurido, poliartralgia e edema periarticular.

b) Caso confirmado de Zika é todo caso suspeito confirmado laboratorialmente: isolamento viral, detecção de RNA viral por RT-PCR e sorologia IgM.

c) Caso descartado de Zika é todo caso suspeito que possui um ou mais dos seguintes critérios: sorologia IgM não reagente, diagnóstico de outra enfermidade, RT-PCR negativo, ou sem exame laboratorial, cuja investigação clínica e epidemiológica seja compatível com outras doenças.

A vigilância epidemiológica das arboviroses no mundo e no Brasil é de fundamental importância, pois é o monitoramento da dinâmica de transmissão que orienta a adoção das medidas de controle e a organização da assistência com o intuito de reduzir a morbimortalidade por elas (COELHO *et al.*, 2016; BRASIL, 2019). Todavia, mesmo sendo doenças de notificação compulsória em muitos países, a subnotificação de casos oculta a verdadeira extensão da carga dessas doenças (SARTI *et al.*, 2016; BRASIL, 2019).

1.5 MEDIDAS DE CONTROLE DO VETOR

A OPAS lançou uma campanha de erradicação do *Aedes aegypti* nas décadas de 1950 e 1960, sobrevivendo importante êxito em seu objetivo. O impacto inicial positivo desta campanha criou uma falsa impressão de que qualquer estratégia de controle do vetor poderia resultar em êxito semelhante. O programa de erradicação foi então encerrado no início da década de 1970 e no fim da mesma houve reinfestação do *Aedes* em muitos locais. O vetor foi reintroduzido no Brasil desde 1976 a partir da cidade de Salvador-BA (TAUIL, 2001).

O controle de vetores continua sendo uma forma prioritária de prevenir a transmissão, entretanto não existem medidas totalmente eficazes e sustentáveis neste setor aptas a garantirem a proteção das comunidades afetadas (ARAÚJO *et al.*, 2015).

Em artigos de revisão, os métodos de controle de mosquitos já disponíveis e outros em desenvolvimento, foram descritos (BALDACCHINO *et al.*, 2015; ZARA *et al.*, 2016):

a) Métodos ambientais: consistem principalmente na remoção ou inativação de potenciais criadouros que incluem uma ampla gama de recipientes que armazenam a água que favorecerá a multiplicação do vetor. As campanhas para a conscientização e educação popular para ajudar os cidadãos a eliminar pequenos recipientes de água em suas propriedades tornaram-se elementos básicos em programas de controle em todo o mundo.

b) Métodos mecânicos: envolvem a captura das fêmeas grávidas dos mosquitos, utilizando-se iscas de odor e a adição de larvicidas nos recipientes de multiplicação dos vetores.

c) Métodos biológicos: consistem em infectar os vetores com micro-organismos como fungos e bactérias, com objetivo de se reduzir a longevidade ou fecundidade dos mesmos. Também se enquadra nesta categoria o uso de predadores de larvas de mosquitos (exemplo: copépodes ciclopoídes); e da *Wolbachia pipientis*, uma bactéria endossimbiótica capaz de induzir incompatibilidade citoplasmática no vetor.

d) Métodos químicos: relacionam-se ao uso de reguladores de crescimento de insetos usados como larvicidas (exemplo: piriproxifeno) e de piretroides usados como adulticidas.

e) Métodos genéticos: vinculam-se à Técnica do Inseto Estéril, que se baseia na liberação de grande número de machos estéreis, após exposição à radiação ou produtos químicos esterilizantes. Envolvem ainda a liberação de insetos carregando um gene letal dominante e um método de interferência no RNA viral, em que a resposta imune do inseto reconhece e degrada o RNA do vírus.

As abordagens tradicionais de prevenção e controle da dengue foram herdadas de programas verticais que almejavam a eliminação de criadouros em habitats domésticos por meio de larvicidas e aplicação de inseticidas por nebulização ultra baixo volume (UBV) (ARAÚJO *et al.*, 2015).

A capacidade de controle do *Aedes aegypti* é limitada. A aplicação de larvicida apresenta baixa cobertura nos criadouros (contêineres) e áreas de risco, o que afeta o controle de longo prazo em virtude da: presença de um grande conjunto de criadouros em qualquer ambiente urbano, da crescente relutância dos residentes em aceitar o uso do larvicida na água potável, do seu custo, do aumento do uso de recipientes descartáveis para armazenamento de água, e da frequência de domicílios fechados. O efeito da

fumigação de inseticidas por UVB é de curta duração em virtude de uma penetração eficaz limitada nos locais de repouso do vetor e tem também uma curta duração com relação à mortalidade da fêmea adulta, uma vez que a população adulta de mosquitos retorna aos níveis de pré-tratamento em duas semanas. Mesmo com várias aplicações, o impacto sobre a incidência da doença é mínimo (GÓMEZ-DANTÉS; WILLOQUET, 2009).

A incapacidade de reduzir de maneira eficiente a densidade do vetor levou ao desenvolvimento de abordagens mais inovadoras e horizontais, como a participação da comunidade, modificação de comportamento e promoção da saúde. No entanto, essas abordagens tiveram também impacto limitado no controle sustentável do amplo espectro dos criadouros em ambientes domésticos e peridomésticos de grandes áreas urbanas (GÓMEZ-DANTÉS; WILLOQUET, 2009).

A dificuldade de controle do *Aedes aegypti* com os métodos tradicionais descritos estimulou o desenvolvimento de novas estratégias. Outro método de controle do vetor foi abordado por Hoffmann *et al.* (2011), que demonstraram que mosquitos portadores de algumas cepas de Wolbachia, um endossimbionte encontrado em muitos insetos, que posteriormente foram infectados pelo DENV, perderam sua capacidade de transmitir o patógeno e concluíram que estratégias baseadas no uso dessa bactéria poderiam ser implantadas como abordagem prática para o controle da dengue.

O interesse em Técnicas dos Insetos Estéreis tem aumentado nos últimos anos, sendo as duas mais importantes a radiação e a transgenia, cujos objetivos são liberar vetores irradiados ou transgênicos, que se tornam incapazes de procriar adequadamente ou produzir descendentes férteis (FERNÁNDEZ-SALAS *et al.*, 2015). O primeiro ensaio de campo envolvendo uma linhagem transgênica do vetor foi em Grand Cayman, em 2009 e 2010. A linhagem transgênica causou uma redução de 80% na população de *Aedes aegypti* selvagem na área testada quando comparada à área de controle (HARRIS *et al.*, 2012). Resultado semelhante foi encontrado em ensaios de campo realizados no Brasil em 2011 (ARAÚJO *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2015). Estudo de modelagem sugere que estratégias combinadas usando Técnicas dos Insetos Estéreis associadas a Wolbachia podem ser mais eficazes do que outras utilizadas isoladamente. Ensaio de campo de larga escala demonstraram a veracidade dessa informação ao longo do tempo (ARAÚJO *et al.*, 2015).

Como o controle do vetor não trouxe resultados sustentáveis e abrangentes, a vacinação oferece perspectivas de melhores oportunidades e resultados duradouros.

Entretanto, sua implantação em áreas endêmicas exige estratégias baseadas em evidências que sejam práticas e viáveis para serem adotadas por programas de saúde local e nacional (AMARASINGHE; MAHONEY, 2011).

1.6 PERSPECTIVAS VACINAIS PARA DENGUE E ZIKA

O desenvolvimento de vacinas tetravalentes eficazes contra a dengue é uma prioridade alta, especialmente em regiões infestadas pelos mosquitos vetores da doença (PANG; MAK; GUBLER, 2017).

Em dezembro de 2015, houve o registro regulatório de uma vacina tetravalente CYD-TDV (Sanofi Pasteur) contra a dengue pela Anvisa no Brasil, sendo também registrada no México, Paraguai, El Salvador e Filipinas, o que trouxe novas expectativas para organizar uma estratégia mais eficiente e sustentável de controle da doença, principalmente nos ambientes urbanos em crescimento. A vacina é aplicada na faixa etária entre nove e 45 anos (ANVISA, 2015). Foi demonstrado o perfil consistente de eficácia e o perfil de segurança de longo prazo em populações com idade entre nove e 16 anos. Em uma análise agrupada de eficácia nesse grupo etário, a vacina demonstrou reduzir a dengue causada pelos quatro sorotipos em dois terços dos pacientes, além prevenir 93% dos casos de dengue grave e oito em cada dez hospitalizações (HADINEGORO *et al.*, 2015). Em ensaio clínico randomizado realizado em 2011-2012, em cinco países latino-americanos onde a dengue é endêmica, foi encontrada para essa vacina eficácia de 50,3% para o DENV1, 42,3% para o DENV2, 74% para o DENV3 e 77,7% para o DENV4, além de eficácia de 80,3% contra a hospitalização devida à doença (VILLAR *et al.*, 2014).

Em 2018, a CYD-TDV foi licenciada para prevenção da dengue em 20 países endêmicos em todo o mundo. Porém, foi evidenciado que pessoas que receberam essa vacina e que não tinham sido previamente expostas ao DENV apresentaram maior risco de dengue grave após a vacinação (SRIDHAR *et al.*, 2018). Em vista disso, em 2018, a Organização Mundial de Saúde (OMS) indicou que essa vacina fosse utilizada somente em regiões endêmicas onde a soroprevalência da dengue é maior que 70% na população alvo, não sendo indicada para menores de nove anos (BOS; GADEA; DESPRES, 2018). Posteriormente, a OMS passou a recomendar um rastreamento pré-vacinal para pessoas entre nove e 45 anos. Com essa estratégia, apenas pessoas com evidências de uma infecção de dengue no passado podem ser vacinadas. Se a triagem pré-vacinal não for viável, a vacinação pode ser considerada em áreas com documentação recente de taxas

de soroprevalência de pelo menos 80% aos nove anos de idade (WHO, 2018; TORRES, 2019). Em 2019, o *Food and Drug Administration* (FDA) também anunciou a aprovação da CYD-TDV em pessoas com idades entre nove e 16 anos que vivem em áreas endêmicas dessa arbovirose (FDA, 2019).

Outras duas vacinas de vírus atenuados contra a dengue estão em estudo. A primeira é a vacina de dengue tetravalente (TDV) da Takeda, cujo ensaio clínico, envolvendo cerca de 20 mil pessoas entre quatro e 16 anos de idade em países da América Latina e da Ásia, encontra-se na fase três, com previsão de término dessa fase até o final de 2021. A outra foi desenvolvida pelo *National Institute of Health* (NIH), sendo licenciada para o Instituto Butantan e encontra-se também na fase três com previsão de término para 2022 (BOS; GADEA; DESPRES, 2018; PROMPETCHARA *et al.*, 2019).

Para a infecção pelo ZIKV, vários ensaios clínicos de vacinas envolvendo DNA ou vírus inativados purificados se encontram na fase um e essas se mostraram seguras e bem toleradas no pequeno número de voluntários e todas induziram anticorpos neutralizantes. Esses resultados sugerem que uma vacina contra Zika pode ser desenvolvida, mas é preciso aguardar os resultados das próximas fases dos ensaios clínicos para se confirmar a viabilidade desse desenvolvimento e quais serão as melhores candidatas ao êxito vacinal (BARRETT, 2018).

1.7 DENGUE/ZIKA: ESTUDOS DE COORTE: PROPORÇÃO DE CASOS ASSINTOMÁTICOS E POTENCIAL DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

Estudos prospectivos têm o potencial de:

- a) Determinar a incidência de doença dentro de uma coorte definida e determinar o risco relativo, análise dos fatores de risco de gravidade da doença e a diversidade espacial e temporal da transmissão do DENV para cada sorotipo específico.
- b) Examinar o impacto da variação ano-a-ano na incidência da dengue, na gravidade da doença e na transmissão específica por sorotipo.
- c) Analisar a carga total da doença a fim de determinar o ônus econômico da infecção por DENV, informações essenciais para que os países possam avaliar as prioridades de saúde e os recursos necessários para o controle de vetores e na determinação do custo-efetividade de uma vacina DENV para prevenir infecção.
- d) Fornecer informações aos desenvolvedores de vacinas para dengue sobre sua incidência para a estimativa do tamanho da amostra para ensaios vacinais e para a

determinação da transmissão espacial e temporal de diferentes sorotipos de DENV para a eficácia da vacina específica para cada sorotipo.

e) Desenvolver infraestrutura do local de campo e a conscientização da comunidade necessária para realizar a fase III de estudos de eficácia da vacina contra a dengue

f) Determinar o espectro dos desfechos clínicos: infecção assintomática, doença sem complicações à doença grave hospitalizada (ENDY; YOON; MAMMEN, 2010).

A infecção assintomática de dengue é definida como infecção pelo DENV que não resulta em manifestações clínicas, ou que é leve e não está associada a uma visita a um profissional de saúde ou que não se associa a uma ausência na escola ou no trabalho devido à doença. A infecção inaparente é aquela não detectada pelo sistema de vigilância. (ENDY *et al.*, 2011). Como a maior parte das infecções por dengue é assintomática, inaparente ou se apresenta como febre indiferenciada de etiologia desconhecida, os sistemas de vigilância com base na monitoração e notificação de casos sintomáticos têm baixa sensibilidade e são incapazes de detectar transmissão baixa ou esporádica (MEDEIROS *et al.*, 2011). Diversos estudos demonstraram grandes lacunas entre o número de casos detectados e o número de casos ocorridos em uma epidemia em particular. É interessante notar que as infecções inaparentes ou casos assintomáticos estão longe de ser um fenômeno fixo nas populações e as evidências sugerem que existe uma grande variação dentro das mesmas populações, áreas geográficas específicas e em diferentes períodos epidemiológicos nas mesmas áreas (SARTI *et al.*, 2016) (Tabela 2).

Assim, essas infecções subclínicas por dengue não são detectadas pelos programas de vigilância que usam a notificação passiva feita quando os doentes procuram atendimento nos serviços de saúde. A maioria das infecções pelo DENV em crianças são inaparentes ou se apresentam como quadros febris indiferenciados (VERHAGEN; GROOT, 2014). A determinação da incidência dessas infecções inaparentes requer estudos prospectivos detalhados em populações de áreas endêmicas onde é possível detectá-las em participantes sem doença clínica durante o tempo de soroconversão por meio de sorologias sequencias para a dengue. Estudos de seguimento também são importantes instrumentos para o conhecimento da história natural das doenças, notadamente nas emergentes como a Zika, no contexto epidemiológico brasileiro. (ENDY *et al.*, 2011, GARCIA, 2018).

Tabela 2. Proporção de infecções inaparentes e casos assintomáticos

Local e período	Autores	População alvo	Assintomático/inaparente (%)
Manágua, Nicarágua	Harris <i>et al.</i> (2000)	≤14 anos	28 vezes mais casos de infecções sintomáticas pelo DENV do que os casos notificados; subnotificação foi maior entre grupos etários mais velhos.
Porto Rico	Meltzer <i>et al.</i> (1998)	Pediátrica e adulta	Ocorrência 10 a 27 vezes maior de casos pelo DENV do que o número efetivamente notificado.
Tailândia	Sirivichayakul <i>et al.</i> (2012)	Idade escolar, 3 a 14 anos	49% a 87% das crianças tailandesas eram assintomáticas.
Nicarágua 2008–2009	Gutierrez <i>et al.</i> (2011)	Crianças entre 6 meses e 14 anos de idade com suspeita de dengue	Predominância do DENV3; razão entre infecção sintomática e infecção inaparente (S:I) de 1:9,5.
Sudeste da Ásia/ América Latina (DENFRAME) 2009–2010	Dussart <i>et al.</i> (2012)	Casos com febre (>2 anos) e membros da mesma residência	45% em membros da mesma residência
Bangkok, Tailândia 1980–1981	Burke <i>et al.</i> (1988)	Idade escolar, 4 a 16 anos	Razão entre infecção S:I de 1:8
Manágua, Nicarágua 2004–2008	Balmaseda <i>et al.</i> (2010)	Idade escolar, 2 a 9 anos	A razão entre as infecções S:I foi de 1:18 durante o primeiro ano do estudo e 1:3 durante o quarto ano do estudo
Java Ocidental, Indonésia 2000-2002	Porter <i>et al.</i> (PORTER <i>et al.</i> , 2005)	Adultos, 18 a 66 anos	A razão S:I foi de 1:3.
<i>Kamphaeng Phet Study I</i> (KPSI) 1998–2002	Endy <i>et al.</i> (2002); Endy, Yoon, Mammen (2010); Endy <i>et al.</i> (2011)	Crianças de escola primária	A razão S:I geral foi de 1:0,9. Algumas escolas apresentaram uma razão S:I de 2:1 em um ano e outra escola apresentou uma razão S:I de 1:9 em outro ano. 66% inaparente; por ano, variou 68% (1998), 66,7% (1999), 81% (2000), 58% (2001), 66% (2002).
<i>Kamphaeng Phet Study II</i> (KPSII) 2004–2008	Mammen <i>et al.</i> (2008)	Crianças de escola primária	Razão S:I de 1:3

Fonte: autoria própria.

2 JUSTIFICATIVA

A sazonalidade é uma singularidade das doenças infecciosas como as arboviroses, DDA e IRAS e é determinada principalmente pelas características da temperatura ambiente, umidade relativa do ar e precipitações pluviométricas. A compreensão ampliada da sazonalidade dessas doenças é fundamental para a melhoria do diagnóstico e da organização dos serviços de saúde para implementação de estratégias de tratamento e prevenção dessas doenças no país (BARCELLOS *et al.*, 2009; RUDAN *et al.*, 2013). Poucos estudos caracterizaram a ocorrência clínica e sazonalidade desses eventos em Goiânia desde a introdução do ZIKV no Brasil.

O controle de vetores continua sendo uma forma prioritária de prevenir a transmissão da dengue, mas o sucesso alcançado por essa estratégia tem sido muito limitado (ARAÚJO *et al.*, 2015). Frente à complexidade de fatores envolvidos na transmissão da dengue, é fundamental a compreensão da dinâmica de transmissão e dos determinantes da doença para as futuras avaliações de impacto de novas tecnologias de controle da doença, incluindo o advento de vacinas (YOKSAN *et al.*, 2009). Nessa perspectiva, os estudos de coorte são apropriados para a compreensão da dinâmica de transmissão de dengue e estabelecer linhas de base anteriores à adoção de novas estratégias de controle. Além disso, esse delineamento de estudo é considerado adequado para se estudar a história natural de doenças emergentes como a Zika. Entretanto, esses estudos trazem grandes desafios operacionais que tendem a dificultar sua execução, especialmente em países em desenvolvimento. A descrição das estratégias bem-sucedidas na implantação e condução desse estudo de seguimento, bem como os desafios enfrentados nesse processo é importante para nortear experiências semelhantes em pesquisas de campo de países em desenvolvimento.

A co-circulação de DENV e ZIKV e a possibilidade de coinfeção, por serem semelhantes, torna o diagnóstico e tratamento das mesmas um desafio para os serviços de saúde, com necessidade de vigilância constante para minimizar seus efeitos na sociedade (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017). A coexistência dos dois vírus existe em países em desenvolvimento como o Brasil, onde há escassez de recursos direcionados à saúde e acesso limitado a exames específicos dessas arboviroses. Embora a infecção pelo ZIKAV seja autolimitada, as preocupações sobre as infecções em gestantes e a possibilidade de defeitos congênitos nos recém-nascidos estão bem descritas (ARAÚJO *et al.*, 2018). Com relação à dengue, infecções com a presença de choque e óbito ocorrem nos quadros graves

(SIMMONS *et al.*, 2012). É importante estabelecer diferenças clínico-laboratoriais entre as duas síndromes em um cenário de alta endemicidade de dengue e com a concomitante circulação do ZIKV, como acontece em Goiânia-GO. Casos de coinfeção dengue/Zika têm sido descritos (DUPONT-ROUZEYROL *et al.*, 2015; CHIA *et al.*, 2017; IOVINE *et al.*, 2017; AZEREDO *et al.*, 2018; ESTOFOLETE *et al.*, 2018), mas, as possíveis formas de apresentações clínicas e laboratoriais e o conhecimento exato sobre a gravidade da dengue ou Zika em indivíduos coinfectados são questões que ainda exigem atenção de especialistas, tornando-se relevante uma nova descrição clínico-laboratorial de casos de coinfeção.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil clínico-laboratorial dos casos de dengue e Zika em uma coorte no município de Goiânia-GO nos anos de 2015 a 2019.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as estratégias aplicadas e os desafios da implantação e condução de uma coorte realizada em município da região central do Brasil.
- Descrever a sazonalidade das principais hipóteses diagnósticas clínicas dos casos febris avaliados durante uma coorte realizada em município da região central do Brasil.
- Comparar a apresentação clínica e achados laboratoriais das infecções pelo DENV e ZIKV encontradas em uma coorte realizada em município da região central do Brasil.
- Descrever o quadro clínico-laboratorial e a evolução clínica dos casos de coinfeção dengue/Zika encontrados em uma coorte realizada em município da região central do Brasil.

4 RESULTADOS

Artigo 1 – Establishing a cohort in Central Brazil: strategies and challenges.

Autores: Siqueira, C. M.; Feres, V.C.R.; Siqueira Júnior, J. B.

Submetido para publicação no periódico **Epidemiology and Health**.

Artigo 2 – Seasonal aspects and clinical evolution of febrile cases in a cohort in Central Brazil, 2015-2019

Autores: Siqueira, C. M.; Feres, V. C. R.; Coutinho, L. A.; Bento, L. M.; Montes, L. S.; Siqueira Jr, J. B.

A ser submetido para publicação no periódico **Epidemiology and Health**.

Artigo 3 – Clinical and laboratory characterization of dengue and Zika cases in a cohort in central Brazil, 2015-2019

Autores: Siqueira, C. M.; Feres, V. C. R.; Coutinho, L. A.; Junqueira; I. C.; Bento, L. M.; Montes, L. S.; Siqueira Jr, J. B.

A ser submetido para publicação em periódico a se definir após a discussão com os membros da banca examinadora e término do artigo.

Artigo 4 – Six cases of Zika/Dengue coinfection in a Brazilian cohort, 2015-2019.

Autores: Siqueira, C. M.; Feres, V. C. R.; Coutinho, L. A.; Junqueira; I. C.; Bento, L. M.; Montes, L. S.; Siqueira Jr, J. B.

Submetido para publicação no periódico científico **Emerging Infectious Diseases**.

4.1 ARTIGO 1

Establishing a cohort in Central Brazil: strategies and challenges

Claudio Morais Siqueira¹

Valéria Christina Rezende Feres²

Livia Aires Coutinho²

Luziane Mendes Bento¹

Larissa Silva Montes¹

João Bosco Siqueira Júnior¹

¹Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública,
Goiânia-GO, Brazil.

²Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, Laboratório Biotec, Goiânia-
GO, Brazil.

Corresponding author: Claudio Morais Siqueira, Alameda Couto Magalhães, número
290, apartamento 1302, Edifício Solar da Aldeia, Setor Pedro Ludovico Goiânia-GO,
CEP: 74825-040. E-mail: morais.cs@gmail.com.

Abstract

Dengue is considered the most important acute febrile arbovirus in the world due to its burden on morbidity and mortality of countries. Cohort studies are appropriate for understanding dengue transmission dynamics and establishing baselines prior to the adoption of new control strategies. However, these studies pose major operational challenges that tend to hinder their execution, especially in developing countries. The strategies used in implanting and conducting a cohort in Central Brazil (city of Goiania) are presented, including the approaches adopted to circumvent the challenges observed. The following steps are described and discussed: defining the field work team, establishing partnerships and the recruitment of participants; the initial serosurvey; technology in field research; and monitoring and evaluation of febrile episodes. A partnership between academia and public health services was the adopted approach and participation of the Municipal Health Secretariat and the Family Health Teams was essential for the proper implementation and conduction of the study. In return, the research the Health Service through surveillance and health care activities for the population. This interinstitutional experience was successful, with benefits for both institutions.

Key words: Dengue; Health Services; Cohort Studies; Research Report.

Introduction

Dengue is considered the most important acute febrile arbovirus in the world due to its burden on morbidity and mortality in countries¹. The disease occurs endemic in more than 100 countries with tropical and subtropical climate² and has become a pandemic throughout the world over the last 50 years, with an increasing incidence of the disease in countries in Africa, Asia, the Americas and Europe³⁻⁶.

The disease is endemic in Brazil since 1986, and was initially observed in large urban centers in the southeast and northeast of the country. Over the following decades, it became endemic/epidemic in 25 of the 27 states of the country, affecting municipalities of all population sizes⁷. From the 2000s onwards, increased frequency of disease, more severe cases and more hospitalizations were observed. The largest epidemics were recorded in 2002, 2008, 2010, 2013, 2015 and 2016, generally reflecting the introduction of new serotypes or the change in the predominant serotype of the circulating virus^{8,9}.

Current dengue control strategies have been very limited in preventing outbreaks^{10,11}, leading to the development of new technologies, including vaccine development and new vector control approaches. Given the complexity of factors involved in dengue transmission, it is essential to understand the transmission dynamics and the determinants of the disease for future impact assessments of these new technologies^{12,13}.

From this perspective, cohort studies are the most adequate design to understand dengue transmission dynamics and establish baseline indicators prior to the adoption of new control strategies. However, these studies present major operational challenges that tend to hinder its execution, especially in developing countries¹⁴. In this article, we present the strategies used to implement and conduct a cohort study in the city of Goiania, capital of the state of Goias, in Central Brazil.

Study design and site

An experience report describing the implementation and conduction of a prospective cohort with the goal of recruiting and monitoring a sample of 2,017 children and adolescents aged over two years. This cohort was intended to be followed clinically and laboratory for 48 months. Participants were living in 17 neighborhoods of the Northern District [Figure 1] of Goiania-GO, Central Brazil. The study was conducted between May 2015 and April 2019. The estimated population of Goiania for 2015 was 1,430,697 inhabitants¹⁵ and the city is located in a semi-humid tropical area with dry winter and rainy summer.

[Insert Fig. 1]

Defining the study team, partnership building and participant recruitment

The initial activities for the development of the study were divided into two lines of action, after the ethics committee approval. The first was the creation of a multiprofessional team involving a general coordinator (epidemiologist), a field coordinator (pediatrician), laboratory professionals, field workers (nurses, biomedical and nursing technicians) and the supporting staff for phone calls and data entry.

The second initial action referred to meetings with the senior staff of the Municipal Health Secretariat (MHS) of Goiania to present the study design and objectives and establish a cooperation with the institution. The study area was then indicated by the MHS, based on two criteria: 1) the presence of structured and active Family Health Strategy Teams (FHST) for the broadcasting of the research and fieldwork; and 2) an area where participants were less likely to migrate. The Family Health Strategy in Brazil has been previously described. Briefly, each family health team is minimally composed by a doctor, a nurse, a nursing technician or assistant, and the Community Health Agents (CHA). CHA live in the territory covered by a FHST and are well aware of the

characteristics of the community, each being responsible for monthly supervision of a part of this territory that contains a maximum of 750 people¹⁶. Therefore, the selection of an area with FHST was due to this close interaction between the CHA and the families, facilitating the researchers' access to families with potential study participants.

Following the selection of the study area, meetings were held with the FHST members (physicians, nurses and CHAs). These discussions were conducted with the presence of a central or district MHS manager. During this first step, the epidemiological scenario of dengue in Brazil and Goiania and the research objectives were presented. Concomitantly, meetings were held with additional partner institutions located in the area, such as schools, social centers, religious institutions, to promote the project to their employees and members.

At the next step, the CHA indicated the names and addresses of the families who had members in the target age groups in their areas of coverage and began to disclose to the community the project proposals. Then, home visits were made to invite them to participate in the research. Priority was given to families who had their own residence in the study area and those who rented, but who had been living in the same place for over a year.

The fieldwork started with a pilot study with the first 50 participants among the families suggested by the CHA with a refusal participation rate of 18.8%. The pilot evaluation was carried out with the entire team in order to identify difficulties and improve all fronts and flows of activities.

The strategies adopted to reduce the refusal rates and improve the overall conduction of the study included: 1) the presence of the pediatrician to invite the families to participate at the time of the initial visit; 2) the convenience to carry out visits during holidays and weekend for the initial serosurvey; 3) home visits by the pediatrician, even

on weekends or holidays, to evaluate fever episodes among participants already recruited. This strategy helped to disseminate the medical care provided by the study among families of the neighborhoods, representing an strengthening of the interpersonal communication of the project proposal; and 4) the inclusion of the pediatrician into the MHS professional registration system in order for treated patients to retrieve the prescription drugs free of charge when available from the public health system.

Initial Serosurvey

At the first visit, a blood sample was collected to determine the participant's serological status at the baseline of the study.

The main challenge observed at this step of the field work routine was a higher refusal rate of those responsible for children between two and four years of age to participate in the project, mainly due to concern regarding the blood collection. Phlebotomy may pose as a challenge even to more experienced health professionals. To address this concern, those responsible were instructed not to try more than one collection on the same day, rescheduling a new appointment for a second attempt. This issue was taken into account before the study started and one of the members of the fieldwork team was a nurse with the expertise for blood collection among younger children. This nurse was in charge of the second attempt if necessary. Despite this strategy, some families gave up participating in the project after the first collection attempt failed. However, over time, 35% of these families requested a new visit from the study group and allowed further attempts, as they received information from other participating families about the benefits of medical evaluation in cases of fever. A second problem was the difficulty in allowing blood collection from participants who required re-collection 14 days after the onset of fever. As they, in this phase of the disease, were already asymptomatic, some

guardians presented resistance in the collection, even after explaining the importance of the exam in an attempt to confirm the diagnosis of dengue.

Another difficulty observed at the early stages of the field work, was that the recruitment of participants and the completion of the first survey was taking more time than previous estimated. The adopted strategy to improve this issue was the hiring of nursing technicians and nurses from the FHST at the research territory. Thus, the recruitment of participants started to be performed both at households or health facilities visits. The inclusion of these professionals was fundamental, facilitating the participation of many families due to the close relationship between the FHST and families in the study area.

The technology in field research

The advantages of using electronic devices such as GPS, tablets, among others in the operationalization of field research have been described¹⁴. However, due to the increasing public safety issues in Brazil, priority was given to manual filing due to the risk of burglary in the study region. Still, a doctor's computer, two cell phones, and a car were stolen during field activities and armed robbery occurred. It was decided not to use the single-member field team, preferably with one male member in each pair, as an attempt to alleviate urban violence.

Monitoring and evaluation of febrile cases

The monitoring of febrile conditions was performed by weekly telephone calls, and the presence of a history of fever, skin rash or an infectious condition suggestive of dengue was questioned. Additionally, at the time of recruitment, the guardians of the children / adolescents were instructed to contact the pediatrician directly via telephone calls, Short Message Service (SMS) or the WhatsApp application.

Fever information triggered a home medical evaluation. Faced with clinical suspicion of dengue or in unspecific febrile conditions, the physician performed the procedures described in Figure 2. In these cases, blood collection for nonspecific (blood count) and specific diagnostic tests (NS1 antigen, anti-dengue IgM antibodies and viral genome detection by RT-PCR) was performed.

[Insert Fig. 2]

Ethical aspects

This research was approved by the Research Ethics Committee of the Medical School of the University of São Paulo (IRB no. 507/13, on January 6, 2014).

Discussion

Longitudinal studies pose a number of challenges for researchers in their conduct. In this article, we present the strategies used to implant and conduct a cohort of children and adolescents to monitor the occurrence of potential dengue cases. Alternatives to the difficulties and limitations observed in this process were also described.

The meetings for the qualification of the project team members were essential for the individual understanding and implementation of a systematic routine of conduct related to the initial serological survey and evaluation of febrile conditions. The pilot evaluation was important to improve the flow of activities and action fronts, eliminating doubts and reducing the errors identified in the evaluation.

Partnering with day care centers, schools and churches was important for spreading and understanding the project's goals in the community. Although no critical points were identified for the study in this initial contact with these institutions, they provided security for families when visited by field teams. This strategy was also adopted in a Phase III preparation study for a clinical trial of a dengue vaccine in Brazil, where meetings were held with key informants, including health professionals, teachers, and

community members to facilitate dissemination of the project and participation of the guests¹⁷.

The conduct of clinical and epidemiological field research supported by public health services has been described, presenting the advantages and challenges of this collaboration^{14,18,19}. In this context, conducting this study in partnership with public health services showed benefits for the project and for the health service. From the project's perspective, the managers indicated a territory where the FHST could assist in the dissemination of the project and suggest families with children and adolescents in the study age group. Knowledge of the characteristics of the population attended by FHST allowed the indication of locations with lower histories of migratory processes to avoid participants' loss of follow-up, a limitation of cohort studies²⁰. This strategy was also adopted previously in other cohorts of children with dengue carried out in Thailand, in which the choice of region for the research was also based on the stability of the local population^{21,22}. In contrast, the provision of home care for febrile children benefited the municipal health system from two perspectives: 1) reduction in the number of medical appointments at USF and Emergency Care Units and 2) notification of confirmed cases of dengue to the surveillance service, since laboratory confirmation occurred within a maximum of three days. Although reporting only confirmed cases is not the routine adopted by the dengue surveillance system, the short time to perform confirmatory tests offered this service the possibility of more timely and accurate action. In general, vector control activities are initiated without laboratory confirmation of the cases, as the traditional surveillance system routine usually has an interval of more than seven days to receive specific test results²³. During the study period, there were no changes in vector control actions carried out by the Goiania Surveillance Service.

Another important point to be emphasized was the impact of the presence of a municipal health secretary manager in meetings with the FHST. In the presence of this manager, a greater presence and involvement of the teams was observed.

In this study, initial blood collection was a cause of refusal to participate, especially for children under four years of age. Jaenish *et al.* (2016)¹⁸, in a multicenter cohort conducted between 2011 and 2016, chose to exclude children under five years of age to avoid the inconvenience of blood collection in this age group. In a cohort of suspected dengue fever cases in Nicaragua (2004-2008), at the time of receiving the annual survey result, participants were given a participation stimulus for a school kit¹⁴. In Thailand, each family of participants in a dengue cohort (2008-2010) received, at the time of registration, a thermometer to measure body temperature²². In our context, no type of adhesion stimulus was used, in accordance with Brazilian legislation (National Health Council Resolution n° 466/2012)²⁴. However, home visiting and the existence of a pediatrician dedicated to the project were strategies adopted for the permanence of the study participants. Still in this perspective, the option of direct contact of the physician with the participants' guardians to inform the results of the exams, from the serology performed during the recruitment to the results of the exams of the feverish conditions, was made with the purpose of narrowing the relationship with the participants, favor communication between families in the project neighborhoods and consequently the reduction of participation refusals and future follow-up losses.

Regarding the monitoring of fevers, it was initially thought that the most appropriate communication strategy would be the weekly telephone call, as reported in another cohort aimed at monitoring acute infectious diseases²⁵. However, many families only attended at night, outside business hours, leading to the need to set up this work period. Over time, those responsible began to use phone calls and especially messages

through the WhatsApp application directly to the doctor as the main means of reporting the occurrence of fever. This application was indeed very useful for communicating with families, establishing the exchange of information quickly and synchronously. The use of short messages to report the onset of fever has also been used in a cohort to assess dengue incidence in Brazil²⁶ and in the Philippines²⁷.

Generally, the follow-up of febrile conditions in cohorts are performed in health units that were part of the research or by nurses in home evaluation^{14,25}. In our study, home pediatric consultations allowed us to establish a close bond with many registered families. However, this bond favored the physician's call for clinical evaluations different from the project proposal. This has become a challenge, which was partially addressed by the team's constant explanation of the research objectives, which did not foresee the replacement of the health system, as well as evaluations of other non-dengue-related complaints.

Field research in Brazil has been challenging, as the scientific mindset is not yet fully incorporated into society. The partnership between academia and health services may be an appropriate strategy in this perspective. The contribution of the MHS and FHS management team was essential for the proper implementation and conduct of this study. On the other hand, the researchers' performance favored the Health Service through surveillance and health care activities of the population. This interinstitutional experience was successful, with benefits for both institutions.

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare for this study.

References

1. Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen van VC, Wills B. Dengue. *N Engl J Med*. 2012; 366(15):1423–1432.
2. Martina BEE, Koraka P, Osterhaus ADME. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22(4):564–581.
3. Medronho RA, Macrini L, Novellino DM, Lagrotta MTF, Câmara VM, Pedreira CE. *Aedes aegypti* immature forms distribution according to type of breeding site. *Am J Trop Med Hyg*. 2009; 80(3):401–404.
4. WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. v. 409, Prevention and Control. Geneva: WHO; 2009. 160 p.
5. WHO. Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. Geneva: WHO; 2012.
6. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet*. 2015; 385(9966):453–465.
7. Ministry of Health. Dengue cases. Brazil, Major Regions and Federative Units, from 1990 to 2013. 2015 [cited 2015 Mar 3]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/752-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/raiva/11431-situacao-epidemiologica-dados>. “Portuguese, author’s translation”.
8. Siqueira JB, Martelli CMT, Maciel IJ, Oliveira RM, Ribeiro MG, Amorim FP, *et al*. Household survey of dengue infection in central Brazil: spatial point pattern analysis and risk factors assessment. *Am J Trop Med Hyg*. 2004; 71(5):646–651.

9. Goiania. Weekly Technical Report: chiukungunya dengue, zika and microcephaly related to infection by zika virus. 2016 [cited 2016 Feb 12]. Available from: https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0ahUKEwjNyree7d_NAhUEFh4KHW5IDIQQFggnMAI&url=http%3A%2F%2Fwww.saude.goiania.go.gov.br%2Fdocs%2Fdivulgacao%2FInforme%2520Semanal%2520Den%2C%2520Chik%2C%2520Zika%2C%2520Micro%252023%2520.
“Portuguese, author’s translation”.
10. Araújo H, Carvalho D, Ioshino R, Costa-da-Silva A, Capurro M. *Aedes aegypti* control strategies in Brazil: incorporation of new technologies to overcome the persistence of dengue epidemics. *Insects*. 2015; 6(2):576–594.
11. Baldacchino F, Caputo B, Chandre F, Drago A, della Torre A, Montarsi F, *et al.* Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. *Pest Manag Sci*. 2015; 71(11):1471–1485.
12. Luz PM, Codeço CT, Massad E, Struchiner CJ. Uncertainties regarding dengue modeling in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(7):871–878.
13. Yoksan S, Tubthong K, Kanitwithayanun W, Jirakanjanakit N. Laboratory assays and field dengue vaccine evaluation at Ratchaburi Province, Thailand: a preliminary result. *J Clin Virol*. 2009; 46(Suppl. 2):S13–S15.
14. Kuan G, Gordon A, Aviles W, Ortega O, Hammond SN, Elizondo D, *et al.* The Nicaraguan pediatric dengue cohort study: study design, methods, use of information technology, and extension to other infectious diseases. *Am J Epidemiol*. 2009; 170(1):120–129.

15. IBGE. Population of Goiânia in 2015. [cited 2016 Nov 13]. Available from:
<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/go/goiania/panorama> . “Portuguese, author’s translation”.
16. Ministry of Health. Ordinance no. 2.436, September 21, 2017. Approves the National Primary Care Policy, establishing the revision of guidelines for the organization of Primary Care, within the scope of the Unified Health System (SUS). “Portuguese, author’s translation”. Available from:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prt2436_22_09_2017.html.
Accessed in: November 23, 2018.
17. Dayan G, Arredondo JL, Carrasquilla G, Deseda CC, Dietze R, Luz K, *et al.*
Prospective cohort study with active surveillance for fever in four dengue endemic countries in Latin America. *Am J Trop Med Hyg.* 2015; 93(1):18–23.
18. Jaenisch T, Tam DTH, Kieu NTT, Van Ngoc T, Nam NT, Van Kinh N, *et al.*
Clinical evaluation of dengue and identification of risk factors for severe disease: protocol for a multicentre study in 8 countries. *BMC Infect Dis.* 2016; 16(1):120.
19. Martínez-Vega RA, Rodríguez-Morales AJ, Bracho-Churio YT, Castro-Salas ME, Galvis-Ovallos F, Díaz-Quijano RG, *et al.* A prospective cohort study to assess seroprevalence, incidence, knowledge, attitudes and practices, willingness to pay for vaccine and related risk factors in dengue in a high incidence setting. *BMC Infect Dis.* 2016; 16(1):705.
20. Eldredge J. Cohort studies in health sciences librarianship. *J Med Libr Assoc.* 2002; 90(4):380–392.

21. Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Jiwariyavej V, Chocejindachai W, Pengsaa K, *et al.* Dengue infection in children in Ratchaburi, Thailand: a cohort study. ii. clinical manifestations. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(2).
22. Tissera H, Amarasinghe A, De Silva AD, Kariyawasam P, Corbett KS, Katzelnick L, *et al.* Burden of dengue infection and disease in a pediatric cohort in urban Sri Lanka. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91(1):132–137.
23. Mandacarú, PMP. Timeliness of the dengue, exanthematic diseases, meningitis and tuberculosis surveillance systems in Brazil. [Dissertation]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública; 2012 (Brazil). Available from: <http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/3568>. “Portuguese, author’s translation”.
24. Ministry of Health. National Health Council. Resolution no. 466, December 12, 2012. Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html. “Portuguese, author’s translation”.
25. Yoon IK, Alera MT, Lago CB, Tac-An IA, Villa D, Fernandez S, *et al.* High rate of subclinical chikungunya virus infection and association of neutralizing antibody with protection in a prospective cohort in the Philippines. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9(5):1–14.
26. Pedro RS, Carvalho MS, Girianelli VR, Damasceno, LS, Leal I, Cunha DC, *et al.* A populational-based birth cohort study in a low-income urban area in Rio de Janeiro, Brazil: implementation and description of the characteristics of the study. *Cad. Saúde Pública.* 2019; 35(5):e00023918. DOI: 10.1590/0102-311X00023918.

27. Alera MT, Srikiatkachorn A, Velasco JM, Tac-An IA, Lago CB, Clapham HE, *et al.* Incidence of dengue virus infection in adults and children in a prospective longitudinal cohort in the Philippines. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(2):1–14.

Figures

Figure 1. Health Sanitary Districts, and location of the Northern Sanitary District of Goiania-GO, Brazil, 2015

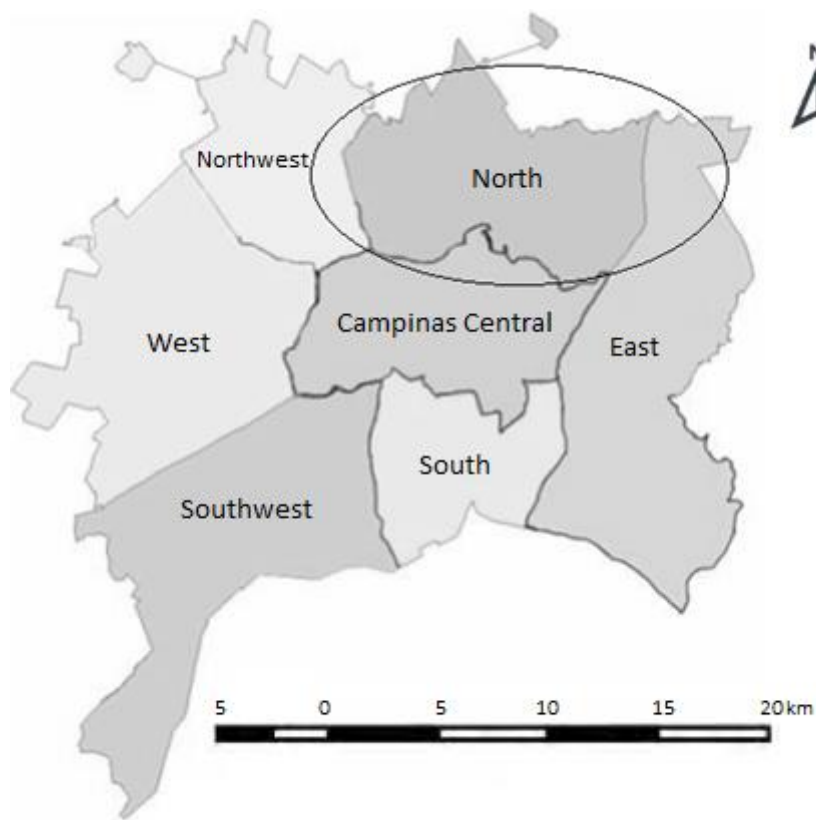
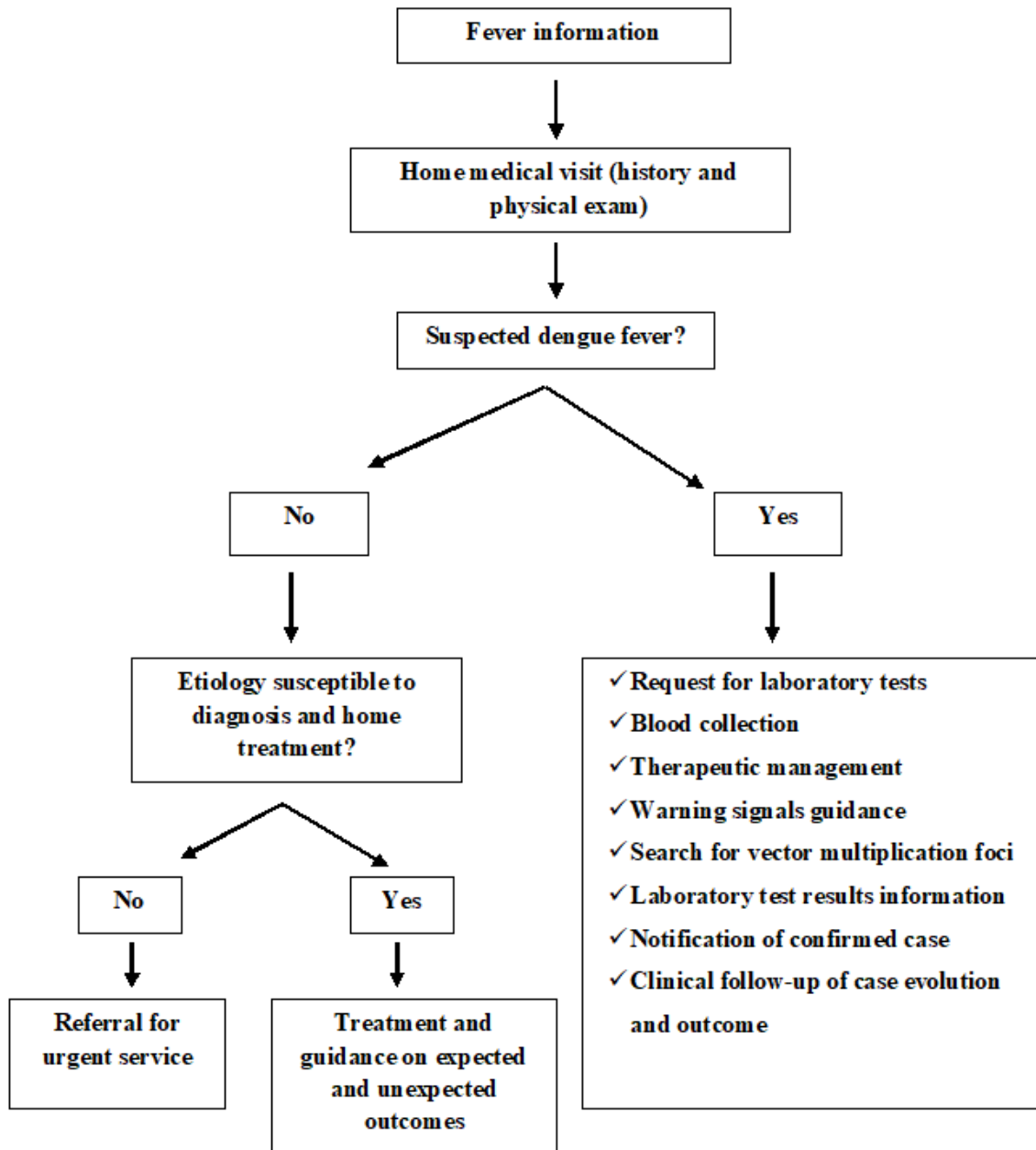


Figure 2. Medical evaluation flowchart of febrile cases in dengue cohort at Goiania-GO, Brazil, 2015-2019



4.2 ARTIGO 2

Seasonal aspects and clinical evolution of febrile cases in a cohort in Central Brazil, 2015-2019

Claudio Morais Siqueira¹

Valéria Christina Rezende Feres²

Lívia Aires Coutinho²

Luziane Mendes Bento¹

Larissa Silva Montes¹

João Bosco Siqueira Júnior¹

¹Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiânia-GO, Brazil.

²Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, Laboratório Biotec, Goiânia-GO, Brazil.

Corresponding author: Claudio Morais Siqueira, Alameda Couto Magalhães, número 290, apartamento 1302, Edifício Solar da Aldeia, Setor Pedro Ludovico Goiânia-GO, CEP: 74825-040. E-mail: morais.cs@gmail.com

Abstract

Objective: describe seasonal aspects and clinical evolution of febrile conditions present in a cohort of children and adolescents, from 2015 to 2019, in Goiania, Goias, Brazil. **Methods:** Fever were monitored weekly by telephone calls to participants' legal guardians and by direct contact from these to the attending physician. After identification of fever, the physician performed a home visit for clinical evaluation. **Results:** 1,268 febrile conditions were evaluated. Acute respiratory infections (ARI) accounted for 53.0%, with 66.7% in children aged two to nine years and 31.9% between April and June.

1.7% suspected pneumonia cases were identified, with 76.2% in children under nine years and 33.4% between April and June. Acute diarrheal disease (ADD) accounted for 8.7%, with 34.2% between five and nine years and 37.9% between January and March. Dengue and Zika represented respectively 11.6% and 6.1% of all cases with a predominance over the age of five (91.9% and 88.3%) and 85.8% of dengue and 84.4% of Zika occurred in rainy months. Conclusions: Previous descriptions of the seasonal profile of ARI, pneumonia, dengue and Zika were in agreement with the results of this research. Studies on the etiology of ADD in Goiania may help the understanding of its seasonality in this region. Understanding these profiles can guide the planning of prevention actions and treatment plans for these diseases over the years. The importance of early assessment and continuous follow-up of patients was emphasized to reduce hospitalizations and prevent deaths from acute infectious diseases.

Key words: Communicable Diseases; Fever; Seasons; Clinical Evolution; Cohort Studies.

Introduction

Despite the reduction in infectious disease incidence and mortality over the past 20 years, it is estimated that they still account for approximately 25.5% of the world's 58.8 million annual deaths. Among them, the two main causes of death are acute respiratory infections (ARI) and gastroenteritis or acute diarrheal disease (ADD)^{1,2}. Both are estimated to account for 40% of all child deaths worldwide each year, with 29% under the age of five, especially those living in remote and poor regions. The burden of these diseases on families and health systems in low-income countries exacerbates existing inequalities^{1,3}. Even though 80% of children deaths worldwide due to ARI and ADD occur in African and Asian countries¹, they have still been described as important causes of children morbidity and mortality in Brazil^{4,5}.

Arboviruses currently represent 30% of acute infectious diseases in the world and constitute a serious public health problem in tropical countries. Dengue is considered the most important acute febrile arbovirus in the world due to its burden on morbidity and mortality in countries⁶. In Brazil, there were peaks of dengue transmission in 2002, 2008, 2010, 2013, 2015 and 2016, with severe cases and deaths⁷. Dengue became hyperendemic

since 2010, with the circulation of four serotypes⁸. Zika virus (ZIKV) infection has been occurring in countries in Oceania, Asia and the Americas, with autochthonous cases identified in Brazil from 2015. In December 2016, the Ministry of Health of Brazil estimated that the number of suspected Zika cases exceeded 216,000⁹. ZIKV infection has been associated with cases of Guillain-Barré and microcephaly¹⁰⁻¹². The co-circulation of infection by these arboviruses, because they are similar, makes their diagnosis and treatment a challenge for health services, requiring constant vigilance to minimize its effects on society¹³.

Seasonality is a uniqueness of infectious diseases such as arboviruses, ADD and ARI and is mainly determined by the characteristics of ambient temperature, relative humidity and rainfall. A broader understanding of the seasonality of these diseases is fundamental for improving the diagnosis and organization of health services to implement treatment and prevention strategies for these diseases in Brazil^{14,15}.

Considering that few studies have characterized the clinical-seasonal occurrence of dengue and Zika since the introduction of ZIKV in Brazil, this study aims to describe these features of febrile conditions present in a cohort study between May 2015 and April 2019 in Central Brazil.

Subjects and Methods

Design and place of study

This is a descriptive study of clinical and epidemiological characteristics of feverish conditions identified in a cohort study in the city of Goiania, capital of the State of Goias, Midwest-Region, Brazil. The municipality has a semi-humid tropical climate, with two well-defined seasons: a rainy season (October to April) and a dry season (May to September). During the year, the temperature usually ranges from 15 °C to 33 °C (annual temperatures averaging around 24°C)¹⁶.

The estimated population of Goiania for 2015 was 1,430,697 inhabitants¹⁷. The cohort was established in the Northern Sanitary District of Goiania, with an estimated population of 143,400 in May 2015, comprising 2,017 members from two to 16 years old. Bedridden people or those with chronic diseases were not invited to be part of the study.

Monitoring of febrile cases

Clinical conditions of fever were monitored weekly by telephone calls to participants' legal guardians and by direct messages from these to the attending physician.

After identification of a feverish case, the attending physician performed a home visit for clinical evaluation of patients and collection of material for diagnosis of dengue/Zika in the suspicion of this diagnosis or in cases with non-specific clinic.

Definitions, clinical classification of cases and laboratory confirmation of dengue/Zika

The clinical criteria used for the suspected diagnosis of ARI (acute symptoms of rhinopharyngitis, pharyngotonsillitis, otitis, sinusitis, laryngitis, tracheobronchitis, pneumonia) and ADD have been described in previous manuscripts¹⁸⁻²². For arboviruses, we used the clinical criteria contained in the Health Surveillance Guide²³. Fever to clarify (FTC) or unspecified fever was defined as measured axillary temperature $\geq 37,5$ °C²⁴ and referred to the situation in which the patient presented fever and no other signs or symptoms.

Rash diseases with distinct clinical features such as chickenpox; infectious mononucleosis; hand, foot and mouth disease; infectious erythema and acute parotitis, as well as other causes of fever such as herpetic stomatitis, urinary tract infection, bacterial lymphadenitis, vaccine reaction, and bacterial cellulitis were excluded analysis because they had a sporadic occurrence (2.8% of all febrile episodes assessed) (Supplementary Table 1).

For the seasons, we considered the following periods: Spring: September 22 to December 21. Summer: December 22 to March 21. Autumn: March 22 to June 21. Winter: June 22 to September 21²⁵. Dengue acute infection was investigated by NS1 antigen (rapid test Dengue NS1Ag STRIP–Bio-rad), NS1 antigen (ELISA-NS1Ag) (Bio-rad Platelia™) and viral RNA using a one-step real-time reverse transcriptase followed by polymerase chain reaction (real time RT-PCR) as previously described²⁶. ZIKV infection was confirmed by real time RT-PCR using a previously validated protocol²⁷.

We considered confirmed dengue cases with common clinical presentation those with positive detection for: 1) dengue NS1 antigen; 2) anti-dengue IgM; 3) DENV RT-PCR and confirmed dengue cases with uncommon clinical presentation those with positive detection for: 1) dengue NS1 antigen; 2) anti-dengue IgM and DENV PRNT (and ZIKV not detected); 3) DENV RT-PCR. We consider confirmed Zika cases those with positive for ZIKV RT-PCR⁹.

Confirmed dengue cases were those with positive detection for: 1) dengue NS1 antigen or 2) anti-dengue IgM or 3) DENV RT-PCR and confirmed Zika cases those with positive for ZIKV RT-PCR²³.

Data analysis

Data management, analysis and tabulation were performed using Tabwin[®] version 4.13 and IBM[®] Statistics SPSS[®] version 22.0, and Microsoft[®] Office Excel 2013[®].

Ethical aspects

This research was approved by the Research Ethics Committee of the Medical School of the University of São Paulo (IRB no. 507/13, on January 6, 2014).

Results

Between May 2015 and April 2019, 1268 febrile conditions were evaluated through home visits. Cases with clinical diagnosis of ARI accounted for 53.0% (n = 672), with 66.7% (n = 448) in children aged two to nine years [Table 1].

[Insert Table 1]

Although observed during all seasons, 31.9% (n = 214) and 27.2% (n = 183) of ARI cases occurred between April and June (autumn) and between October and December (spring), respectively [Figure 1].

[Insert Figure 1]

1.7% (n = 21) suspected pneumonia cases were identified, with 76.2% (n = 16) in children under nine years of age (Table 1). 33.4% (n = 7) occurred in autumn (between April and June) and 33.4% (n = 7) in winter (between July and September) [Figure 1].

Suspected ADD cases accounted for 8.7% (n = 111), with the highest proportion of cases found between five and nine years (34.2%) [Table 1]. They were attended during all seasons, but 37.9% (n = 42) occurred between January and March (summer) [Figure 1].

Suspected cases of dengue and Zika represented respectively 11.6% (n = 148) and 6.1% (n = 77) of febrile conditions, with a predominance of both diseases over the age of five years (91.9% and 88.3%) [Table 1]. These arboviruses were clinically suspected

during all seasons, but 66.3% (n = 98) of dengue cases and 81.9% (n = 63) of Zika cases occurred in the rainy months (October to April) [Table 2].

[Insert Table 2]

Other 16.0% of febrile cases (n = 203) were classified as fever to be clarified, 63.1% in children aged two to nine years (n = 128) [Table 1] and 53.7% between October and March (n = 109) [Figure 1]. Among them, 12 (5,9%) and 10 (4,9%) were respectively laboratory confirmed as dengue and Zika (data not shown in table).

One participant (0.15%) with clinical diagnosis of ARI, two (1.8%) with ADD and one (4.8%) with pneumonia were admitted for hospital treatment. Among the suspected cases of dengue, 15 (10.1%) were kept in health facilities or hospitalized for intravenous hydration. There were no hospitalizations in the cases related to Zika virus infection and also in those classified as fever to clear up, as they showed benign evolution. There were no deaths recorded during the follow-up period.

Discussion

This study described seasonal aspects of the main clinical diagnostic hypotheses present in the evaluation of 1,268 febrile cases: ARI/ pneumonia, ADD, dengue, Zika and fever to clear up. These hypotheses were present during all seasons in the evaluated period. There was, however, a predominance of ARI in autumn and spring; pneumonia in autumn and winter; ADD in summer and dengue/Zika in rainy season.

ARI represent one of the main causes of care in health services and mainly affect children and the elderly²⁸⁻³¹. In this study, they were the most frequent cause of fever assessment, with a predominance in younger children. The incidence of ARI has been shown to decline with age³². Factors such as daycare, immaturity of the immune system, malnutrition, and poor sanitation contribute to the higher incidence among infants and preschoolers³³⁻³⁵.

ARI are more frequent in cold months, especially in temperate regions^{36,37} due to some factors already reported: 1) low air humidity that increases the survival of viruses and also causes cooling of the nasal mucosa, increasing susceptibility to etiological agents; 2) longer permanence of people indoors, which favors transmission^{38,39}. However, in places where winter is mild, just like in Goiania, the strength of the relationship between ARI and school periods has been highlighted, since the aggregation of people in

the school years increases transmission^{40,41}, which may explain the higher frequency of suspected cases of this study between April and June (autumn) and October and December (spring).

Clinical suspicion of pneumonia predominated in autumn and winter. This disease usually occurs as a complication of a viral respiratory tract infection, as viruses alter defense mechanisms by modifying secretions, inhibiting phagocytosis, altering microbiota, and reducing ciliary movement of the airways^{42,43}. Just like in this study, community pneumonias predominate in Brazil in autumn and winter⁴². Cases of viral pneumonias are more frequent in winter^{44,45} due to agglomerations that increase transmission⁴⁶. Pneumococcal pneumonia cases are more frequently described in autumn due to the aggregation of children in the school period, but also in winter due to cold weather, lower humidity, the crowding together of susceptible hosts and associated viral infections^{41,44,47}. Influenza infection is known to increase the risk of bacterial pneumonia⁴⁸ and, in Brazil, infections by this virus predominate in autumn and winter⁴⁴. It should be considered that the small number of pneumonia suspected cases found in our study is a limiting factor for the analysis of this disease seasonality.

ADD in developing countries is more frequent in children under five years⁴, but in this study, only 26.1% of suspected cases occurred in children from two to four years old, in which children are institutionalized, favoring crowding and close contact to others; poor hand hygiene and pathogen-spreading habits⁴⁹. ADD predominated in our results in participants aged five to nine years, according to the trend of ADD cases in Brazil migrating to older children (age over six years), following rotavirus vaccine implementation in the national vaccination schedule⁵⁰.

ADD is more frequent in summer or winter, according to etiological agents and the predominant form of transmission. Bacterial cases predominate in summer and in developing countries through oral fecal transmission or pathogens transmission by contaminated food. Factors can explain this predominance: 1) increased intake of improperly prepared or maintained food, 2) improper bathing, 3) inadequate sanitation, 4) increased summer temperature and air humidity that may favor the proliferation and survival of pathogens outside the host⁵¹⁻⁵⁴. In temperate climates, rotavirus infections predominate in winter due to respiratory transmission⁵⁵. In Brazil, rotavirus diarrheal conditions tend to be equally distributed throughout the year, but with a predominance in the coldest and driest period in the Central, South and Southeast regions⁵⁰. The cases followed in this study, although predominating in the summer, did not present clinical

characteristics suggestive of bacterial etiology, such as the presence of dysenteric stools, prolonged evolution of symptoms and/or need for antibiotic therapy. A possible explanation would be the presence of norovirus as an etiological agent in part of these cases, which transmission occurs through contaminated water and food and in human agglomerations, mainly spreading through interpersonal contact⁵⁶. Norovirus cases were more frequently described in summer and rainy season in the Southern Hemisphere⁵⁷ and in some places in Brazil such as the city of São Paulo⁵⁸ and the Central Region, including Goiania⁵⁹.

The suspected cases of dengue and Zika in this study predominated in participants older than five years. For dengue, the fact that the disease has greater pathogenicity and more specific symptoms in schoolchildren and adolescents is a factor that favors diagnostic suspicion in older children^{60,61}.

The finding of dengue and Zika cases in the rainy months of Goiania is in accordance with the literature^{62,63}. In addition to the vector depositing its eggs in still water⁶³, it has a reproductive cycle sensitive to temperature variations, which is related to the seasonal influence of the disease in the warmer and wetter months. The frequency of the blood meal by the vector is influenced by the ambient temperature. Smaller mosquitoes feed more often than larger mosquitoes and higher temperatures may increase immature development resulting in smaller mosquitoes. Higher temperatures also speed up the digestion of the blood meal, which makes the vector need to feed more frequently⁶⁴. Although the incidence decreases when the temperature decreases in the second half of the year, there is no interruption of the transmission chain, being possible to verify its endemic character.

Fever to clear up represents a challenge for the physician's performance. Trotta and Gilio (1999)⁶⁵ considered that, in pediatrics, after adequate clinical history and physical examination, in approximately 20% of febrile cases it is not possible to identify the etiological focus after the final clinical evaluation. The same happened in this study in 16% of cases. The cases of fever to be clarified predominated in the rainy season, coinciding with the seasonality of dengue and Zika, but only 5.9% of them were confirmed as dengue and 4.9% as Zika.

Most cases of ARI treated at health services are mild, but serious complications requiring hospital treatment such as orbital cellulitis, cavernous sinus thrombosis, brain abscess, mastoiditis, meningitis, among others are reported^{5,30}. Dehydration, metabolic acidosis and electrolyte disturbances are the frequent complications of ADD that increase

the need for hospitalization in children⁵¹. Sequential clinical evaluation, follow-up of fever duration and guidance on characteristics and onset of severity warning signs performed in the initial assessment and follow-up of children are important factors for early detection of complications of acute infectious diseases, aiming to reduce the frequency of hospitalization and mortality due to these diseases^{1,28,51}. These conducts were implemented by the care team of this research and, during the follow-up period, there was a low proportion of cases of hospitalizations for ARI, ADD and pneumonia, and no death record due to these etiological suspicions.

Dengue patients with severity warning signs fall within a specific risk classification suggested by the Ministry of Health and the most important conduct in this group is venous fluid replacement until hemodynamic stabilization⁷. Guidance for detection these warning signs with consequent early assessment of venous hydration were made to the participants' guardians at the moment of medical evaluations and during follow-up of suspected cases, avoiding delay in the initiation of appropriate therapy and no death from this arbovirus was recorded.

One limitation of this study was the impossibility of confirming cases of coinfection in our clinical evaluations, since no complementary exams were performed to confirm the diagnosis of all clinical hypotheses of febrile conditions evaluated.

Conclusions

Previous descriptions of the seasonal profile of ARI, pneumonia, dengue and Zika were in agreement with the results of this research. New studies on the etiology of ADD in Goiania may help the understanding of its seasonality in this region. Understanding these seasonal profiles can guide prevention actions and treatment plans for these diseases over the years. The importance of early assessment and continuous follow-up of patients was emphasized to reduce hospitalizations and prevent deaths from acute infectious diseases.

References

1. World Health Organization. Ending preventable child deaths from pneumonia and diarrhoea by 2025 The integrated Global Action Plan for Pneumonia and Diarrhoea (GAPPD). Geneva: World Health Organization; 2013. 12 p.

2. Fauci AS, Morens DM. The perpetual challenge of infectious diseases. *New Engl J Med*. 2012;366(13):454–61.
3. World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Vol. 409, Prevention and Control. Geneva; 2009. 160 p.
4. Pedraza DF, Queiroz D, Sales MC. Infectious diseases among Brazilian preschool children attending daycare centers. *Cien Saude Colet*. 2014;19(2):511–28. “Portuguese, author’s translation”.
5. Silva-Filho EB, Silva AL, Santos AO, Dallacqua DSV, Souza LFB. Respiratory infections of clinical importance: a systematic review. *Rev Fimca*. 2017;4(1):7–16. “Portuguese, author’s translation”.
6. Simmons CP, Farrar JJ, Chau NV, Wills B. Dengue. *N Engl J Med* 2012;366:1423–32.
7. Brazil. Ministry of Health. Dengue diagnosis and clinical management: adult and child. 5. ed. Brasília: Ministry of Health; 2016. 60 p. “Portuguese, author’s translation”.
8. Temporão JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, Azevedo RSS, Nunes MRT, *et al*. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(5):938–40.
9. Hennessey M, Fischer M, Staples JE. Zika Virus spreads to new areas — region of the Americas, May 2015 – January 2016. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(3):55–8.
10. Oehler E, Watrin L, Larre P, Lastère S, Valour F, Baudouin L, *et al*. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report , French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill*. 2014;19(9):1–3.
11. Araujo LM, Ferreira MLB, Nascimento OJM. Guillain-Barré syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*. 2016;4(3):253–5.

12. Albuquerque MFPM, Souza WVS, Araújo TVB, Braga MC, Miranda-Filho DB, Ximenes RAA, *et al.* The microcephaly epidemic and Zika virus: building knowledge in epidemiology Epidemia de microcefalia y virus Zika: la construcción del conocimiento en epidemiología. *Cad Saúde Pública*. 2018;34(P):1–14.
13. Donalisio MR, Freitas ARR, Zuben APB. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. *Rev Saude Publica*. 2017;31(30):10–5. “Portuguese, author’s translation”.
14. Barcellos C, Monteiro AMV, Corvalán C, Gurgel HC, Carvalho MS, Artaxo P, *et al.* Climatic and environmental changes and their effect on infectious diseases: scenarios and uncertainties for Brazil. *Epidemiol Serv Saúde*. 2009;18(3):285–304. “Portuguese, author’s translation”.
15. Rudan I, O’Brien KL, Nair H, Liu L, Theodoratou E, Qazi S, *et al.* Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative pathogens for 192 countries. *J Glob Health*. 2013;3(1).
16. Climate-Data.org. Climate of Goiania. [cited 2016 Nov 13]. Available from: <https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/goias/goiania-2191>. “Portuguese, author’s translation”.
17. IBGE. Population of Goiânia in 2015. [cited 2016 Nov 13]. Available from: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/go/goiania/panorama> . “Portuguese, author’s translation”.
18. Pitrez PMC, Pitrez JLB, Acute upper respiratory tract infections: outpatient diagnosis and treatment. *J Pediatr (Rio J)*. 2003;79(Supl.1):S77-S86.
19. Boletim da Sociedade de Pediatria de São Paulo. *Pediatria Atualize-se*. 2016; 1(3). Available from: <https://www.spsp.org.br/site/asp/boletins/AT5.pdf>.
20. Boletim da Sociedade de Pediatria de São Paulo. *Pediatria Atualize-se*. 2016; 1(5). Available from: <https://www.spsp.org.br/site/asp/boletins/AT3.pdf>.

21. II Diretrizes Brasileiras no Manejo da Tosse Crônica. *J Bras Pneumol*. 2006;32(Supl 6):S403-S446.
22. Sociedade Brasileira de Pediatria. Guia prático de atualização departamento científico de gastroenterologia: diarreia aguda: diagnóstico e tratamento. 2017; 1. Available from: https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/2017/03/Guia-Pratico-Diarreia-Aguda.pdf.
23. Brazil. Ministry of Health. Health Surveillance Secretariat. General Coordination for the Development of Epidemiology in Services. Health Surveillance Guide: single volume. 3rd. ed. - Brasília: Ministry of Health, 2019. 740 p. “Portuguese, author’s translation”
24. Ogoina D. Fever, fever patterns and diseases called 'fever'--a review. *J Infect Public Health*. 2011 Aug;4(3):108-24.
25. Fiocruz. Estações do ano. Available from: <http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/infantil/estacoes-ano.htm>.
26. Huhtamo E1, Hasu E, Uzcátegui NY, Erra E, Nikkari S, Kantele A, *et al*. Early diagnosis of dengue in travelers: comparison of a novel real-time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology. *J Clin Virol*. 2010 Jan;47(1):49-53.
27. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, *et al*. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(8):1232-9.
28. Pitrez PMC, Pitrez JLB. Acute upper respiratory tract infections - outpatient diagnosis and treatment. *J Pediatr (Rio J)*. 2003;79(1):77–86. “Portuguese, author’s translation”.
29. Waldman EA, Sato APS. Path of infectious diseases in Brazil in the last 50 years: an ongoing challenge. *Rev Saude Publica*. 2016;50(68):1–18.

30. Pereira VS, Rosa AM, Hacon SS, Castro HA, Ignotti E. Analysis of outpatient visits for respiratory diseases in the Municipality of Alta Floresta, State of Mato Grosso - Brazilian Amazon. *Epidemiol Serviços Saúde*. 2011;20(3):393–400. “Portuguese, author’s translation”.
31. Segurado AC, Cassenote AJ, Luna EA. Metropolitan health - infectious diseases *Estud Avançados*. 2016;30(86):29–49. “Portuguese, author’s translation”.
32. Monto AS. Epidemiology of viral respiratory infections. *Am J Med*. 2002;112(Suppl):4S–12S.
33. Ball TM, Holberg CJ, Aldous MB, Martinez FD, Wright AL. Influence of attendance at day care on the common cold from birth through 13 years of age. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2002;156(2):121–6.
34. Chiesa AM, Westphal MF, Akerman M. Acute respiratory diseases: a study on health inequalities. *Cad Saude Publica*. 2008;24(1):55–69. “Portuguese, author’s translation”.
35. Allan MG, Arroll, B. Prevention and treatment of the common cold: making sense of the evidence. *Cmaj*. 2014;186(3):190–9.
36. Eccles R. An explanation for the seasonality of acute upper respiratory tract viral infections. *Acta Otolaryngol*. 2002;122(2):183–91.
37. Thomazelli LM, Vieira S, Leal AL, Sousa TS, Oliveira DBL, Golono MA, *et al*. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in Southeast Brazil. *J Pediatr (Rio J)*. 2007;83(5):422–8.
38. Eccles R, Fietze I, Rose U. Rationale for treatment of common cold and flu with multi-ingredient combination products for multi-symptom relief in adults. *Open J Respir Dis*. 2014;04(03):73–82.
39. D’Amato G, Cecchi L, Annesi-Maesano I, Calabrese G, D’Amato M, Molino A. The impact of cold on the respiratory tract and its consequences to respiratory health. *Clin Transl Allergy*. 2018;8(1):1–8.

40. Johnston S, Holgate S. Epidemiology of viral respiratory tract infections. *Viral and other infections of the human respiratory tract*. 1996. 38 p.
41. Altizer S, Dobson A, Hosseini P, Hudson P, Pascual M, Rohani, P. Seasonality and the dynamics of infectious diseases. *Ecol Lett*. 2006;9(4):467–84.
42. Bedran, RM, Andrade, CR, Ibiapina, CC, Fonseca, MTM, Alvim, CG, Bedran, MBB. Community-acquired pneumonia in childhood and adolescence. *Rev Med Minas Gerais*. 2012, 22 (Supl 7): S40-47. “Portuguese, author’s translation”.
43. Wardlaw T, Salama P, Johansson EW, Mason E. Pneumonia: the leading killer of children. *Lancet*. 2006 Sep 23; 368 (9541): 1048-50.
44. Dowel SF. Seasonal variation in host susceptibility and cycles of certain infectious diseases. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(3):369–74.
45. Alonso WJ, Viboud C, Simonsen L, Hirano EW, Daufenbach LZ, Miller MA. Seasonality of influenza in Brazil: a traveling wave from the amazon to the subtropics. *Am J Epidemiol*. 2007;165(12):1434–42.
46. Dushoff J, Plotkin JB, Levin SA, Earn DJD. Dynamical resonance can account for seasonality of influenza epidemics. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(48):16915–6.
47. Wright C, Rose CE, Whitney CG, Dowell SF, Schuchat A. Seasonal patterns of invasive pneumococcal disease. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(5):573–9.
48. Shrestha S, Foxman B, Berus J, Van Panhuis WG, Steiner C, Viboud C, *et al*. The role of influenza in the epidemiology of pneumonia. *Sci Rep*. 2015;5:1–13.
49. Nesti MMM, Goldbaum, M. Infectious diseases and daycare and preschool education. *J Pediatr (Rio J)*. 2007;83(4):299–312.
50. Luchs A, Timenetsky MCST. Group A rotavirus gastroenteritis: post-vaccine era, genotypes and zoonotic transmission. *Einstein (São Paulo)*. 2016;14(2):278–87.
51. Elliott EJ. Acute gastroenteritis in children. *Br Med J*. 2007;334(7583):35–40.
52. Grimwood K, Forbes DA. Acute and persistent diarrhea. *Pediatr Clin North Am*. 2009;56(6):1343–61.

53. Müller L, Korsgaard H, Ethelberg S. Burden of acute gastrointestinal illness in Denmark 2009: A population-based telephone survey. *Epidemiol Infect.* 2012;140(2):290–8.
54. Chen Y, Yan WX, Zhou YJ, Zhen SQ, Zhang RH, Chen J, *et al.* Burden of self-reported acute gastrointestinal illness in China: a population-based survey. *BMC Public Health.* 2013;13(456):1–10.
55. Desai R, Curns AT, Steiner CA, Tate JE, Patel MM, Parashar UD. All-cause gastroenteritis and rotavirus-coded hospitalizations among US children, 2000-2009. *Clin Infect Dis.* 2012;55(4):28–34.
56. Marshall JA, Hellard ME, Sinclair MI, Fairley CK, Cox BJ, Catton MG, *et al.* Incidence and characteristics of endemic Norwalk-like virus-associated gastroenteritis. *J Med Virol.* 2003;69(4):568–78.
57. Morillo SG, Timenetsky MCST. Norovirus: an overview. *Rev Assoc Med Bras.* 2011;57(4):462–7. “Portuguese, author’s translation”.
58. Kamioka GA, Madalosso G, Pavanello EI, Sousa SCZ, Bassit NP, Sato APS. Norovirus in São Paulo city, Brazil, 2010-2016: a cross-sectional study of the leading cause of gastroenteritis in children. *Epidemiol. Serv. Saude, Brasília,* 28(2):e2018290, 2019. DOI: 10.5123/S1679-49742019000200016.
59. Borges AMT, Teixeira JMS, Da Costa PSS, Giugliano LG, Fiaccadori FS, Franco RC, *et al.* Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central Region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(7):721–4.
60. Mishra S, Ramanathan R, Agarwalla SK. Clinical profile of dengue fever in children: a study from Southern Odisha, India. *Scientifica (Cairo).* 2016;2016:1–6.
61. Verhagen LM, Groot R. Dengue in children. *J Infect.* 2014;69(1):77–86.
62. Siqueira JB, Martelli CM, Maciel IJ, Oliveira RM, Ribeiro MG, Amorim FP, *et al.* Household survey of dengue infection in central Brazil: spatial point pattern analysis and risk factors assessment. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(5):646–51.

63. Viana DV, Ignotti E. The occurrence of dengue and weather changes in Brazil: A systematic review *Rev Bras Epidemiol.* 2013;16(2):240–56. “Portuguese, author’s translation”.
64. Endy TP, Yoon I, Mammen MP. Prospective cohort studies of dengue viral transmission and severity of disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010;338:1–13.
65. Trotta E, Gilio A. Acute fever without source in infants and children less than 36 months of age. *J Pediatr (Rio J).* 1999;75 Suppl 2:214–22.

Figures and Tables

Table 1. Clinical diagnosis of febrile cases evaluated in the cohort of children and adolescents according to age group. Goiania-GO, Brazil, May 2015 to April 2019

Clinical suspicion	Age range (years)				Total
	2 - 4	5 - 9	10 - 14	15 - 19	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Acute respiratory infections	219 (32.6)	229 (34.1)	144 (21.4)	80 (11.9)	672 (53.0)
Pneumonia	8 (38.1)	8 (38.1)	4 (19.0)	1 (4.8)	21 (1.7)
Acute diarrheal disease	29 (26.1)	38 (34.2)	33 (29.8)	11 (9.9)	111 (8.7)
Dengue	12 (8.1)	48 (32.4)	42 (28.4)	46 (31.1)	148 (11.6)
Zika	9 (11.7)	22 (28.6)	29 (37.6)	17 (22.1)	77 (6.1)
Fever to clear up	55 (27.1)	73 (36.0)	43 (21.2)	32 (15.7)	203 (16.0)

Figure 1. Clinical diagnosis of febrile cases evaluated in the cohort of children and adolescents according to seasons, Goiania-GO, Brazil, May 2015 to April 2019.

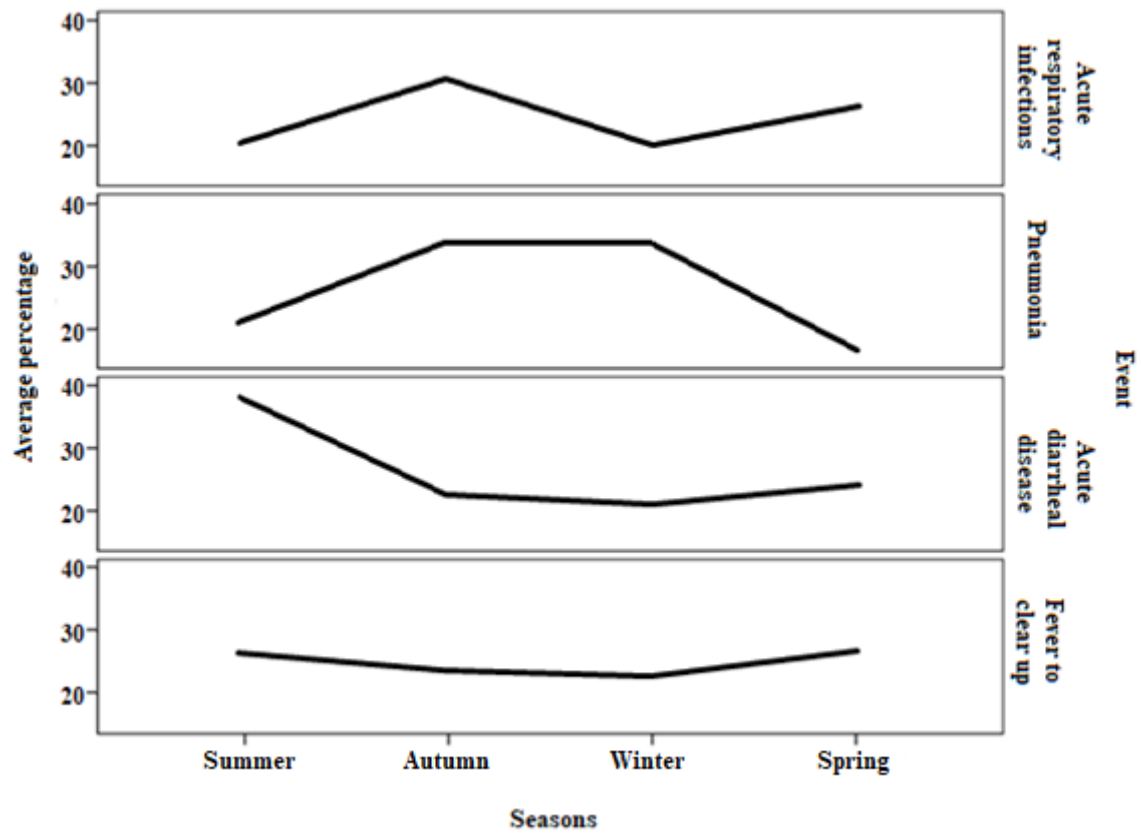


Table 2. Clinical diagnoses of dengue and Zika according to dry / rainy seasons. Goiania-GO. Brazil. May 2015 to April 2019

Clinical diagnosis	May-September (dry season)	October-April (rainy season)
	n (%)	n (%)
Dengue	50 (33.7)	98 (66.3)
Zika	14 (18.1)	63 (81.9)

Supplementary Tables

Table 1. Other clinical hypotheses of febrile cases. Goiania-GO. Brazil. May 2015 to April 2019

Clinical diagnosis	Jan - Mar	Apr - Jun	Jul - Sep	Oct - Dec	Total
	(Summer)	(Autumn)	(Winter)	(Spring)	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Other causes	2 (15.4)	3 (23.1)	3 (23.1)	5 (38.4)	13 (100.0)
Other exanthematic diseases	3 (13.0)	6 (26.1)	8 (34.8)	6 (26.1)	23 (100.0)

4.3 ARTIGO 3

Clinical and laboratory characterization of dengue and Zika cases in a cohort in Central Brazil, 2015-2019

Claudio Morais Siqueira¹

Valéria Christina Rezende Feres²

Lívia Aires Coutinho²

Isabela Cinquini Junqueira²

Luziane Mendes Bento¹

Larissa Silva Montes¹

João Bosco Siqueira Júnior¹

¹Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiânia-GO, Brazil.

²Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, Laboratório Biotec, Goiânia-GO, Brazil.

Corresponding author: Claudio Morais Siqueira, Alameda Couto Magalhães, número 290, apartamento 1302, Edifício Solar da Aldeia, Setor Pedro Ludovico Goiânia-GO, CEP: 74825-040. E-mail: morais.cs@gmail.com.

Introduction

Dengue epidemics in Brazil have been frequent since the 1980s¹. In 2015, the presence of Zika virus (ZIKV) was identified in Brazil² and in 2016, there was an explosion of suspected cases reported¹.

Zika virus (ZIKV) and dengue virus (DENV) are mosquito-borne RNA viruses belonging to the family Flaviviridae^{3,4}. They coexist in Brazil, where virus-specific diagnostics are not routinely available in health services. These arboviruses are of concern to public health authorities because of the risk of severe dengue cases and the risk of fetal malformation in Congenital Zika Syndrome^{3,5,6}.

Differentiating these infections early is important in the prognostication and subsequent monitoring and follow-up of these patients⁷. Definition criteria for clinical

suspicion of dengue and Zika were established⁸ and dengue/Zika simple clinical predictors were described⁷, however, the presentation patterns of these diseases are not always typical, which limits the accuracy of a clinical diagnosis based on exam findings and results of routine laboratory testing.

The aim of this study was to describe and analyze the clinical and laboratory presentation patterns of dengue and Zika cases during four years of follow-up of suspected cases in Central Brazil.

Methods

From May 2015 to June 2019, we followed 2,017 participants from a cohort in Goiania, capital of Goias State, Brazil. Participants' initial age was two to 16 years.

The initial objective of the research was to study the dynamics of dengue transmission in this highly endemic region. However, suspected cases of Zika began to be investigated after the outbreak of this arbovirus epidemic in 2016.

To investigate the annual immune status for dengue we used the enzyme-linked immunoassay test (ELISA) for the detection of dengue IgG antibodies (Dengue Virus IgG DxSelect™ FOCUS Diagnostics, Inc., Cypress, California 90630 USA) as instructed by the manufacturer.

Febrile cases were monitored weekly by telephone calls to the participants' legal guardians and by direct contact from these to the attending physician. The axillary temperature (Tax) of each reported febrile case was measured at least once a day by family members or by professionals of the family health teams or by members of the research. Participants with Tax ≥ 37.5 (one single episode) were evaluated by the physician⁹. Rash cases, even with < 37.5 , started to be monitored in the middle of 2015.

After identification of a feverish and/or rash condition, the attending physician performed a home visit for clinical evaluation of patients and collection of blood/urine for diagnosis of acute dengue/Zika infection in the suspicion of these diagnoses.

We used the clinical criteria for defining suspected dengue (fever, usually between two and seven days, and two or more of the following manifestations: nausea/vomiting; rash; myalgia/arthritis; headache or retroorbital pain; petechiae/positive tourniquet test; leukopenia) and Zika (itchy skin rash accompanied by at least one of the following signs or symptoms: low fever; conjunctival hyperemia/non-purulent conjunctivitis; arthralgia/polyarthralgia; periarticular edema) cases suggested by the Brazilian Ministry of Health⁸. The warning signals evaluated were: severe and continuous abdominal pain;

persistent vomiting; fluid accumulation (ascites, pleural effusion, pericardial effusion); postural hypotension and/or lipothymia; lethargy and/or irritability; hepatomegaly; mucosal bleeding; and progressive increase in hematocrit⁸. We called "uncommon dengue presentation" the confirmed cases that did not have the common clinical presentation of dengue described by the Ministry of Health⁸, such as: high fever lasting between two and seven days, diffuse skin rash starting after the third day of symptoms and involvement of the general condition. On the contrary, these cases had no fever or, when present, the fever was low and short duration; the skin rash was intense, diffuse and appeared until the second day of the disease and the other symptoms remained for another three to six days after the appearance of the rash. There was no involvement of the general condition in these cases.

Dengue acute infection was investigated by NS1 antigen (rapid test Dengue NS1Ag STRIP–Bio-rad), NS1 antigen (ELISA-NS1Ag) (Bio-rad Platelia™) in samples collected between the second and seventh day of disease and viral RNA using an one-step real-time reverse transcriptase followed by polymerase chain reaction (real time RT-PCR) as previously described¹⁰, in serum collected up to the seventh day of the onset of signs and symptoms. The seroconversion of anti-dengue IgM/IgG antibodies was investigated using the Dengue Virus IgM Capture DxSelect™ FOCUS Diagnostics, Inc., Langenhagen-Hannover, Germany; and IgG DxSelect™ FOCUS Diagnostics, Inc., Cypress, California, USA). Sample for anti-IgM antibodies was collected in the first seven days of symptoms and when negative, a new collection was performed between 14 and 21 days. The seroconversion of anti-Zika IgG antibodies was investigated using Euroimmun Anti-ZikV IgG ELISA, following the manufacturer's instructions.

ZIKV infection was confirmed by real time RT-PCR using a previously validated protocol¹¹, in serum samples collected up to the seventh day of the onset of signs and symptoms and/or urine samples with first collection up to the seventh day of the onset of signs and symptoms and second collection between the tenth and twentieth day after the onset of signs and symptoms. Viral RNA was extracted from the serum and urine samples using the commercial High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics, Applied Science, Germany) following the manufacturer's instructions.

Dengue and Zika serotype-specific neutralizing antibodies (NAbs) were determined in serum samples by Plaque Reduction Neutralization test (PRNT) following a modified protocol by Morens *et al.* (1985)¹² and according to WHO guidelines¹³. A positive result was considered when DENV NAbs levels were $\geq 1:20$. The PRNT

reciprocal dilution positivity was defined based on a 90% reduction in plaque counts (PRNT90).

We considered confirmed dengue cases with common clinical presentation those with positive detection for: 1) dengue NS1 antigen; 2) anti-dengue IgM; 3) DENV RT-PCR and confirmed dengue cases with uncommon clinical presentation those with positive detection for: 1) dengue NS1 antigen; 2) anti-dengue IgM and DENV PRNT (and ZIKV not detected); 3) DENV RT-PCR. We consider confirmed Zika cases those with positive for ZIKV RT-PCR⁸.

For retrospective assessments, Odds Ratio (OR) calculation was performed on the OpenEpi program website.

This research was approved by the Research Ethics Committee of the Medical School of the University of São Paulo (IRB no. 507/13, on January 6, 2014).

Results

Between May 2015 and June 2019, 1345 febrile episodes were evaluated and 206 cases of dengue (15.3%) were confirmed. Among these, 166 (80.6%) (Table 1) had common clinical presentation according to the definition of suspected case of dengue suggested by the Brazilian Ministry of Health: fever between two and seven days, accompanied by two of the following manifestations: nausea/vomiting; rash; myalgia/arthralgia; headache or retroorbital pain; petechiae/positive tourniquet test. Fever was moderate to high, diffuse rash arises after the third day of symptom onset and the general condition was affected (Table 2).

[Insert Table 1]

[Insert Table 2]

Headache, myalgia, and retroorbital pain were the most frequent non-specific symptoms, and cold sweating and postural dizziness were the most found alarm signs. 5.4% of the cases required venous hydration and there was no death. 61.5% had leukopenia and 48.8% thrombocytopenia (Table 2). Among patients with dengue common clinical presentation, the one who presented fever lasting less than two days did not have skin rash and Tax was high (39.5°C). The six patients with early skin rash had fever lasting longer than three days and intensity higher than 38°C.

Among the 206 confirmed cases of dengue, 40 (19.4%) (one case in 2016, two in 2017, 10 in 2018 and 27 in 2019) (Table 1) had uncommon presentation characterized by absence of or low fever, short duration fever; early diffuse maculopapular or morbilliform skin rash and the general condition was not affected. Two participants had late skin rash but no $Tax \geq 37.5$ (Table 3). Headache, retroorbital pain and myalgia were the most frequent non-specific symptoms and no alarm sign was found. None of the cases required venous hydration and there was no death. 55.0% had leukopenia and 22.5% thrombocytopenia (Table 3). The sample of the first participant with uncommon dengue presentation in 2019 was sent to the Dr. Giovanni Cysneiros State Public Health Laboratory (LACEN-GO) and the RT-PCR was positive, with identification of DENV 2. Of all dengue cases with uncommon clinical presentation, 11 presented only anti-dengue IgM antibodies detected (RT-PCR and NS1Ag not detected). PRNT for Zika was done in these cases and ZIKV NAbs were not detected (data not shown in tables).

[Insert Table 3]

We made a retrospective analysis using the previous positivity of IgG dengue antibodies for a group of cases with uncommon clinical presentation compared to another with common clinical presentation of the disease. We also made a retrospective analysis using the previous positivity of IgG Zika antibodies for a group of cases with uncommon clinical presentation compared to another with common clinical presentation of the disease. In both analyzes, cases and controls were initially matched by age, sex and year of infection. The results are shown in Table 4.

[Insert Table 4]

In our study, 37 cases of acute ZIKV infection were confirmed (Table 1). However, skin rash, considered the guiding symptom of a suspected Zika case (itchy skin rash accompanied by at least one of the following signs or symptoms: low fever; conjunctival hyperemia/non-purulent conjunctivitis; arthralgia/polyarthralgia; joint edema) was absent in 45.9% of confirmed cases. Of 20 cases in which rash was present, 17 (85.0%) appeared until the second day of symptoms. Although with low frequency, there were cases of fever lasting three days (17.2%) and with intensity between 38.3°C and 39.0°C (17.3%). Headache, retroorbital pain, myalgia and conjunctive hyperemia

were the most frequent non-specific symptoms, but respiratory and gastrointestinal symptoms were moderately frequent. 62.1% had leukopenia and 16.5% thrombocytopenia (Table 5).

[Insert Table 5]

The positive predictive value of clinical dengue suspicion was 85.8% and the positive predictive value of clinical Zika suspicion was 16.5% (Table 6).

[Insert Table 6]

In members of same family, in same month, the following cases were identified: only Zika cases; only common dengue cases; only uncommon dengue cases; common and uncommon dengue cases. No cases of common or uncommon dengue and Zika were identified simultaneously in the same family (Table 7).

[Insert Table 7]

Discussion

The results of this study showed that the majority (81.0%) of dengue cases had common clinical presentation, but, mainly in 2019, 19.0% had uncommon clinical presentation with: 1) milder general symptoms, with absence or presence of low and short-term fever and 2) presence of early maculopapular or morbilliform generalized skin rash, not meeting the criteria for defining suspected cases suggested by the Brazilian Ministry of Health. In dengue, the initial rash involves a flushing erythema of the face, neck, and chest that typically occurs within the first 24–48 h of the onset of symptoms. The subsequent rash, that occurs between the third and fifth day after the onset of symptoms, is characterized by a generalized maculopapular or morbilliform eruption¹⁴⁻¹⁷. Mahboob *et al.* (2012)¹⁸ considered that these characteristics of skin lesions can be a clue to the diagnosis in difficult cases, but, in our study, an early generalized skin rash pattern was present in 94.9% of uncommon cases, appearing until the second day of disease, differing from the known classical presentation.

Studies have shown that tertiary and quaternary infections with DENV are typically thought to be milder^{19,20}. Thus, the first related hypothesis to explain the

uncommon clinical presentation of dengue was the possibility of these participants having a third or fourth episode of dengue. However, in contrast to this hypothesis, cases with uncommon clinical presentation were associated with previous IgG dengue seronegativity. Anderson *et al.* (2014)²¹ showed that a shorter time interval between infections was associated with subclinical infection in children seronegative for DENV at enrollment, but, in our study, most cases of dengue with mild symptomatology (60.5%) had negative previous IgG, suggesting first infection.

A recent study found that high pre-existing dengue virus antibody titers were associated with reduced risk of ZIKV infection and reduced onset of symptoms²² and the findings of a pediatric cohort in Nicaragua supported that prior DENV infection may protect individuals from symptomatic Zika²³. However, little is known about the role of a previous ZIKV exposure on subsequent DENV infection. The behalf of the Salvador Arboviral Research Group suggested in 2018 that the reduction of DENV cases after the ZIKV epidemic is due to protection from cross-reactive immune responses between these viruses²⁴. The findings of Pérez-Guzmán *et al.* (2019)²⁵ of highly cross-reactive response against DENV in presence of previous ZIKV immunity with no exacerbation of DENV pathogenesis may contribute to explain the decrease of detected DENV cases after ZIKV epidemic in the Americas. The second hypothesis raised to explain the milder symptoms found in a part of dengue cases in this study was the possibility of a previous ZIKV infection is associated with a milder clinical presentation of dengue. However, the association between previous IgG Zika seropositivity and the uncommon clinical presentation of dengue was not found in our results.

The symptomatology of dengue cases with uncommon clinical presentation presented a similar pattern to previous description of Zika cases, due to the similarity of symptoms between them, but in our analysis, in the same month and in the same family, dengue cases were confirmed with only common clinical presentation, only with uncommon clinical presentation, only with Zika, as well as cases with common and uncommon clinical presentation simultaneously. However, no simultaneous cases of Zika and dengue with uncommon presentation were found, which reduces the possibility of interpreting these uncommon dengue cases as false negative diagnoses for Zika. Besides that, uncommon cases were more frequent in 2019, year not considered epidemic for Zika. In addition, we performed external control of complementary tests, sending some samples to the Dr. Giovanni Cysneiros State Public Health Laboratory (LACEN-GO) to improve the quality of the results.

According to Brazilian Ministry of Health⁸, the definition of a suspected case of acute ZIKV infection includes itchy skin rash accompanied by at least one of the following signs or symptoms: low fever; conjunctival hyperemia/non-purulent conjunctivitis; arthralgia/polyarthralgia; periarticular edema⁸. Approximately 46% of confirmed cases of Zika did not meet the suspicious case definition criteria suggested by the Ministry of Health, with no skin rash as a guiding symptom. Since rash is the most frequent symptom described in Zika²⁶⁻³⁰, its absence can make the clinical suspicion of the disease more difficult and this may be related to the low positive predictive value of clinical suspicion of Zika found in this study. This fact may also affect the diagnosis in pregnant women, where the consequences of the disease may be more severe for the fetus. In this sense, similarly to our results, Azeredo *et al.* (2018)³¹ showed in confirmed cases of Zika that rash was not the most frequent symptom in patients with Zika and Estofolete *et al.* (2016)³² described that of 13 confirmed cases for Zika, only two (15.4%) had skin rash. Yan *et al.* (2018)⁷ showed that the diagnostic indices of conjunctivitis, platelet count, and monocyte count reliably distinguished between dengue and Zika and rash was also not prominent among Zika patients in their study either.

Even recognizing the increased cost to public health in developing countries, in areas of co-circulation of DENV and ZIKV, the use of specific laboratory tests should be necessary to implement prevention actions appropriately against these diseases. Due to the small number of Zika confirmed cases in this study, studies with larger samples should be considered for the best evaluation of this arbovirus symptoms.

Referências

1. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49 de 2018. Bol Epidemiológico. 2018;49(59):1–14.
2. Fantinato FFST, Araújo ELL, Ribeiro IG, Andrade MR, Dantas ALM, Rios JMT, *et al.* Descrição dos primeiros casos de febre pelo vírus Zika investigados em municípios da região Nordeste do Brasil, 2015. Epidemiol e Serv Saúde. 2016;25(4):683–90.
3. Simmons CP, Farrar JJ, Chau N van V, Wills B. Dengue. N Engl J Med. 2012;366:1423–32.

4. Sikka V, Chattu VK, Popli RK, Galwankar SC, Kelkar D, Sawicki SG, *et al.* The emergence of zika virus as a global health security threat: A review and a consensus statement of the INDUSEM Joint working Group (JWG). *J Glob Infect Dis.* 2016;8(1):3–15.
5. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science.* 1988 Jan 29;239(4839):476–81.
6. de Araújo TVB, Ximenes RAA, Miranda-Filho DB, Souza WV, Montarroyos UR, de Melo APL, *et al.* Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: final report of a case-control study. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(3):328–36.
7. Yan G, Pang L, Cook AR, Ho HJ, Win MS, Khoo AL, *et al.* Distinguishing zika and dengue viruses through simple clinical assessment, Singapore. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(8):1565–8.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde [Internet]. 3rd ed. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços.; 2019. 740 p. Available from: http://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/publicacoes/guia_vigilancia_saude_volume_unico_3_ed.pdf
9. Ogoina D. Fever, fever patterns and diseases called 'fever'--a review. *J Infect Public Health.* 2011 Aug;4(3):108-24.
10. Huhtamo E, Hasu E, Uzcátegui NY, Erra E, Nikkari S, Kantele A, *et al.* Early diagnosis of dengue in travelers: comparison of a novel real-time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology. *J Clin Virol.* 2010;47(1):49–53.
11. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(8):1232–9.
12. Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Raybourne N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: Comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol.* 1985;22(2):250–4.
13. Roehrig JT, Hombach J, Barrett ADT. Guidelines for plaque-reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. *Viral Immunol.* 2008;21(2):123–32.

14. Lupi O, Carneiro CG, Coelho ICB. Manifestações mucocutâneas da dengue. *An Bras Dermatol.* 2007;82(4):291-305.
15. Thomas E, John M, Kanish B. Mucocutaneous manifestations of dengue fever. *Indian J Dermatol.* 2010;55(1):79–85.
16. Azfar NA, Malik LM, Jamil A, Jahangir M, Tirmizi N, Majid A, *et al.* Cutaneous manifestations in patients of dengue fever. *J Pakistan Assoc Dermatologists.* 2012;22(4):320–4.
17. Huang HW, Tseng HC, Lee CH, Chuang HY, Lin SH. Clinical significance of skin rash in dengue fever: a focus on discomfort, complications, and disease outcome. *Asian Pac J Trop Med.* 2016;9(7):713–8.
18. Mahboob A, Iqbal Z, Javed R, Taj A, Munir A, Saleemi MA, *et al.* Dermatological manifestations of dengue fever. *J Ayub Med Coll.* 2012;24(1):52–4.
19. Gibbons R V., Kalanarooj S, Jarman RG, Nisalak A, Vaughn DW, Endy TP, *et al.* Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(5):910–3.
20. Olkowski S, Forshey BM, Morrison AC, Rocha C, Vilcarromero S, Halsey ES, *et al.* Reduced risk of disease during postsecondary dengue virus infections. *J Infect Dis.* 2013;208(6):1026–33.
21. Anderson KB, Gibbons RV, Cummings DAT, Nisalak A, Green S, Libraty DH, *et al.* A shorter time interval between first and second dengue infections is associated with protection from clinical illness in a school-based cohort in Thailand. *J Infect Dis.* 2014;209(3):360–8.
22. Rodriguez-Barraquer I, Costa F, Nascimento EJM, Júnior NN, Castanha PMS, Sacramento GA, *et al.* Impact of preexisting dengue immunity on Zika virus emergence in a dengue endemic region. *Science.* 2019;363(6427):607–10.
23. Gordon A, Gresh L, Ojeda S, Katzelnick LC, Sanchez N, Mercado JC, *et al.* Prior dengue virus infection and risk of Zika: a pediatric cohort in Nicaragua. *PLoS Med.* 2019;16(1):1–16.
24. Ribeiro GS, Kikuti M, Tauro LB, Nascimento LCJ, Cardoso CW, Campos GS, *et al.* Does immunity after Zika virus infection cross-protect against dengue? *Lancet Glob Heal.* 2018;6(2):e140–1.

25. Pérez-Guzmán EX, Pantoja P, Serrano-Collazo C, Hassert MA, Ortiz-Rosa A, Rodríguez IV, *et al.* Time elapsed between Zika and dengue virus infections affects antibody and T cell responses. *Nat Commun.* 2019;10(1):1–14.
26. Ho ZJM, Hapuarachchi HC, Barkham T, Chow A, Ng LC, Lee JMV, *et al.* Outbreak of Zika virus infection in Singapore: an epidemiological, entomological, virological, and clinical analysis. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(8):813–21.
27. Romer Y, Valadez-Gonzalez N, Contreras-Capetillo S, Manrique-Saide P, Vazquez-Prokopec G, Pavia-Ruz N. Zika virus infection in pregnant women, Yucatan, Mexico. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(8):1452–60.
28. Orantes L del C, Lozano ALR, Méndez SG. Zika virus infection in pregnant women in a General Hospital of Veracruz, Mexico. *J Matern Neonatal Med.* 2019;1–5.
29. Vega FLR, Bezerra JMT, Said RFC, Neto ANG, Cotrim EC, Mendez D, *et al.* Emergence of chikungunya and zika in a municipality endemic to dengue, Santa Luzia, MG, Brazil, 2015-2017. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2019;52: e-20180347.
30. Griffin I, Zhang G, Fernandez D, Cordero C, Logue T, White SL, *et al.* Epidemiology of pediatric zika virus infections. *Pediatrics.* 2017;140(6): e20172044.
31. Azeredo EL, dos Santos FB, Barbosa LS, Souza TMA, Badolato-Corrêa J, Sánchez-Arcila JC, *et al.* Clinical and laboratory profile of Zika and dengue infected patients: lessons learned from the co-circulation of dengue, Zika and chikungunya in Brazil. *PLoS Curr.* 2018;10:1–20.
32. Estofolete CF, Terzian ACB, Parreira R, Esteves A, Hardman L, Greque GV, *et al.* Clinical and laboratory profile of Zika virus infection in dengue suspected patients: a case series. *J Clin Virol.* 2016;81:25–30.

Tables

Table 1. Characterization of dengue and Zika cases according to sex and age group.

Variables	Common dengue n (%)	Uncommon dengue n (%)	Zika n (%)
Sex			
male	85 (51.2)	22 (55.0)	17 (46.0)
female	81 (48.8)	18 (45.0)	20 (54.0)
Age range (years)			
2-4	12 (7.2)	1 (2.5)	4 (10.9)
5-9	45 (27.1)	12 (30.0)	8 (21.6)
10-14	57 (34.3)	13 (32.5)	12 (32.4)
≥ 15	52 (31.4)	14 (35.0)	13 (35.1)
Total	166 (100.0)	40 (100.0)	37 (100.0)

Table 2. Clinical and laboratory characterization of confirmed dengue cases with common clinical presentation

Signals / symptoms	N (%)	Signals / symptoms	N (%)	Alarm signals/clinical outcome	N (%)
Fever	166(100.0)	Headache	142(85.5)	Cold sweating	21 (12.6)
<u>Duration</u>		Myalgia	110(66.2)	Postural dizziness	20 (12.0)
< 2 days	1 (0.6)	Retrocular pain	107(64.4)	Incoercible vomiting	9 (5.4)
2-7 days	165 (99.4)	Nausea	85 (51.2)	Severe abdominal pain***	6 (3.6)
> 7 days	0	Mild abdominal pain	80 (48.2)	Dyspnea	1 (0.6)
<u>Maximum Tax</u>		Arthralgia	62 (37.3)	Lethargy	0 (0)
Not measured	12 (7.2)	Vomiting	44 (26.5)	Intravenous serotherapy	19 (11.4)
<37.5°C	0 (0)	Sore throat	36 (21.7)	Death	0 (0)
37.5°C – 37.9°C	3 (1.8)	Cough	36 (21.7)	Blood count	N (%)
38.0°C-38.4°C	24 (14.5)	Diarrhea	31 (18.6)	<u>Leukocytes (cells / mm³)</u>	
>38.4°C	127 (76.5)	Runny nose	2 (13.2)	< 4,000	102(61.5)
<u>Diffuse skin rash</u>		Mild bleeding	13 (7.8)	≥ 4,000	64 (38.5)
Absence	84 (50.6)	Tourniquet test +	8 (4.8)	<u>Platelets (cells / mm³)</u>	
Early *	6 (3.7)	Conjunctive hyperemia	7 (4.2)	< 150,000	81 (48.8)
Late **	76 (45.8)	Joint edema	2 (1.2)	≥ 150,000	85 (51.2)

*Onset up to 2 days. **Onset 3 days or more. *** Severe and continuous abdominal pain (informed by the patient or identified in the clinical examination)

Table 3. Clinical and laboratory characterization of confirmed dengue cases with uncommon clinical presentation

Signals and symptoms	N (%)	Signals and symptoms N=39	N (%)	Alarm signals/clinical outcome	N (%)
Fever n = 40		Headache	23 (57.5)	Dyspnea	-
Absence	21 (51.3)	Retrocular pain	23 (57.5)	Severe abdominal pain	-
Presence	19 (48.7)	Myalgia	21 (52.5)	Incoercible vomiting	-
<u>Duration N =19</u>		Nausea	15 (37.5)	Postural dizziness	-
1 day	13 (68.4)	Arthralgia	13 (32.5)	Cold sweating	-
2 days	6 (31.6)	Conjunctive hyperemia	10 (25.0)	Lethargy	-
3-7 days	-	Diarrhea	8 (20.0)	Intravenous serotherapy	-
> 7 days	-	Mild abdominal pain	6 (15.0)	Death	-
<u>Maximum intensity N =19</u>		Runny nose	5 (12.5)	Blood count	N (%)
37.5°C – 38.2°C	19 (100)	Vomiting	3 (7.5)	<u>Leukocytes (cells / mm³)</u>	
≥38.3°C	-	Cough	3 (7.5)	< 4,000	22 (55.0)
Diffuse skin rash N=40		Joint edema	3 (7.5)	≥ 4,000	18 (45.0)
Absence	-	Sore throat	2 (5.0)	<u>Platelets (cells / mm³)</u>	
Early *	38 (95.0)	Mild bleeding	1 (2.5)	< 150,000	9 (22.5)
Late **	2 (5.0)	Tourniquet test +	0 (0)	≥ 150,000	31 (77.5)

*Onset up to 2 days. **Onset 3 days or more.

Table 4. Comparison between common and uncommon clinical presentation of dengue according to previous seropositivity for IgG dengue/Zika

Previous serostatus	Uncommon dengue (n)	Common dengue (n)	OR (CI 95%)	p-value
Prior dengue IgG+	17	34	0.33 (0.13-0.78)	0.006
Prior dengue IgG-	23	15	1	
Prior Zika IgG+	2	7	0.31 (0.06-1.61)	0.084
Prior Zika IgG-	38	42	1	

Table 5. Clinical and laboratory characterization of confirmed Zika cases.

Signals and symptoms	n (%)	Signals/symptoms (n=37)	n (%)	Alarm signals/clinical outcome	n (%)
<u>Fever (n=37)</u>		Headache	27 (73.0)	Dyspnea	-
Absence	8 (21.6)	Retrocular pain	23 (62.1)	Severe abdominal pain	-
Presence	29 (78.4)	Myalgia	23 (6.1)	Incoercible vomiting	-
<u>Duration (days) n=29</u>		Conjunctive hyperemia	22 (59.4)	Postural dizziness	-
1	14 (48.3)	Nausea	17 (45.9)	Cold sweating	-
2	10 (34.5)	Mild abdominal pain	14 (37.8)	Lethargy	-
3	5 (17.2)	Sore throat	12 (32.4)	Intravenous serotherapy	-
≥ 4	-	Arthralgia	11 (29.7)	Death	-
<u>Maximum Tax (n =29)</u>		Diarrhea	11 (29.7)	Blood count	N (%)
37.5°C – 38.2°C	24 (82.7)	Cough	11 (29.7)	<u>Leukocytes (cells / mm3) N=36</u>	
38.3°C - 39°C	5 (17.3)	Runny nose	10 (27.0)	< 4,000	23 (62.1)
<u>Diffuse skin rash (n=37)</u>		Vomiting	9 (24.3)	≥ 4,000	14 (37.9)
Absence	17 (45.9)	Joint edema	5 (13.5)	<u>Platelets (cells / mm3) N=36</u>	
Early *	17 (45.9)	Mild bleeding	-	< 150,000	5 (16.5)
Late **	3 (8.2)	Tourniquet test +	-	≥ 150,000	32 (83.5)

*Onset up to 2 days. **Onset 3 days or more.

Table 6. Positive Predictive Value of clinical dengue and Zika suspicion

Suspected	Confirmed (n)	Not confirmed (n)	Total (n)	Positive Predictive Value (%)
Dengue	146	24	170	85.8
Zika	16	81	97	16.5

Table 7. Common dengue, uncommon dengue and Zika cases in members of the same family.

Families	Age	Sex	Year	Common dengue	Uncommon dengue	Zika
1						
Member A	5	male	2015	No	No	Yes
Member B	10	male	2015	No	No	Yes
2						
Member A	16	male	2019	No	Yes	No
Member B	19	female	2019	Yes	No	No
3						
Member A	14	female	2019	Yes	No	No
Member B	20	female	2019	No	Yes	No
4						
Member A	10	male	2019	No	Yes	No
Member B	15	female	2019	Yes	No	No
Member C	47	male	2019	Yes	No	No
Member D	50	female	2019	No	Yes	No
5						
Member A	13	male	2019	Yes	No	No
Member B	13	male	2019	Yes	No	No
Member C	43	female	2019	Yes	No	No
6						
Member A	9	male	2019	No	Yes	No
Member B	15	male	2019	Yes	No	No
7						
Member A	17	male	2019	Yes	No	No
Member B	20	female	2019	Yes	No	No
8						
Member A	12	female	2019	Yes	No	No
Member B	14	male	2019	Yes	No	No
Member C	15	male	2019	Yes	No	No
9						
Member A	10	male	2019	No	Yes	No
Member B	14	female	2019	No	Yes	No

4.4 ARTIGO 4

Six cases of Zika/dengue coinfection in a Brazilian cohort, 2015-2019

Claudio Morais Siqueira¹

Valéria Christina Rezende Feres²

Livia Aires Coutinho²

Isabela Cinquini Junqueira²

Luziane Mendes Bento¹

Larissa Silva Montes¹

João Bosco Siqueira Júnior¹

¹Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, Brazil.

²Laboratório Biotec, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, Brazil.

Corresponding author: Claudio Morais Siqueira, Alameda Couto Magalhães, número 290, apartamento 1302, Edifício Solar da Aldeia, Setor Pedro Ludovico Goiânia-GO, CEP: 74825-040. E-mail: morais.cs@gmail.com

Abstract

We report a case series of coinfection of Zika and Dengue viruses (ZIKV and DENV) among participants of a prospective cohort in Central Brazil from 2015 to 2019. In this series, clinical and laboratory presentation and clinical evolution of these arboviruses' cases were described. The clinical outcomes were suggestive for both DENV and ZIKV infection. No coinfecting patient had neurological manifestation, warning signs or shock. A continuous specific laboratory confirmation for both Dengue and Zika viruses should be enforced as part of the surveillance systems even in the presence of very suggestive cases of dengue fever, minimizing the risk of a late detection of ZIKV circulation.

Introduction

Dengue is currently considered the most important arboviruses in the world due to its impact on morbidity, mortality and economy of countries¹. Brazil is one of the most affected countries by dengue epidemics in the past decade. This scenario became more challenging with the emergence of Zika (ZIKV) and Chikungunya viruses after 2014, including difficulties in specific diagnostic due to cross reaction of laboratory tests².

ZIKV and dengue virus (DENV) are mosquito-borne RNA viruses belonging to the family Flaviviridae. The cocirculation of these viruses makes their diagnosis and treatment a challenge for health professionals, especially due to similar clinical outcomes³. Dengue/Zika coinfection has been described, but clinical and laboratory presentations and the exact knowledge about the severity of dengue or Zika in co-infected individuals are issues that still require further investigation⁴⁻⁸. Here, we present a cases series of ZIKV/DENV coinfection detected in a prospective cohort study in a highly endemic setting in Central Brazil.

The study

From May 2015 to June 2019, we followed a cohort of 2017 participants in the city of Goiania, capital of Goias State, Central Brazil. Participants' initial age was two to 16 years and blood samples were also collected for feverish case evaluations of some older siblings or parents.

The initial objective of the research was to study the dynamics of dengue transmission in a highly endemic scenario. However, ZIKV emerged in the area, leading to an outbreak in 2016 with sporadic cases in the following years.

Febrile cases were monitored weekly by telephone calls to the participants' legal guardians and by direct contact to the attending physician. After identification of a feverish condition, the attending physician performed a home visit for clinical evaluation of patients and collection of blood/urine for diagnosis of acute dengue/Zika infection in suspected cases. We used the clinical criteria for defining suspected dengue: fever lasting from two to seven days and two or more of the following manifestations: nausea/vomiting; late rash (fourth day of symptom onset onwards); myalgia/arthritis; headache or retroorbital pain; petechiae/positive tourniquet test; leukopenia. The criteria for defining suspected Zika cases was: itchy skin rash accompanied by at least one of the following signs or symptoms: low fever; conjunctival hyperemia/non-purulent conjunctivitis; arthralgia/polyarthralgia; periarticular edema. Rash usually appears on the

first day or second day of symptom onset. These definitions are adopted by the Brazilian Ministry of Health⁹. The warning signs evaluated were: severe abdominal pain; persistent vomiting; fluid accumulation (ascites, pleural effusion, pericardial effusion); postural hypotension and/or lipothymia; lethargy and/or irritability; hepatomegaly; mucosal bleeding; and progressive increase in hematocrit⁹.

To investigate the annual immune status for dengue we used the enzyme-linked immunoassay test for the detection of dengue IgG antibodies (Dengue Virus IgG DxSelect™ FOCUS Diagnostics, Inc., Cypress, California 90630 USA) as instructed by the manufacturer.

Dengue acute infection was investigated by NS1 antigen (rapid test Dengue NS1 Ag STRIP-Bi-orad), NS1 antigen (Bio-rad™ Platelia Dengue NS1Ag) and detection of viral RNA using an one-step real-time reverse transcriptase followed by polymerase chain reaction (real time RT-PCR) as previously described¹⁰, in serum collected up to the seventh day of the onset of symptoms. The seroconversion of anti-dengue IgM/IgG antibodies was investigated using the Dengue Virus IgM Capture DxSelect™ FOCUS Diagnostics, Inc., Langenhagen-Hannover, Germany; and IgG DxSelect™ FOCUS Diagnostics, Inc., Cypress, California, USA). Sample for anti-IgM antibodies was collected in the first seven days of symptoms and when negative, a new collection was performed between 14 and 21 days.

ZIKV infection was confirmed by real time RT-PCR using a previously validated protocol¹¹, in serum samples collected up to the seventh day of the onset of symptoms. Two urine samples were also collected (one up to the seventh day and another between the 10-20th day after the onset of symptoms). Viral RNA was extracted from the serum and urine samples using the commercial High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche™ Diagnostics, Applied Science, Germany) following the manufacturer's instructions.

Dengue serotype-specific neutralizing antibodies (NAbs) were determined in serum samples by Plaque Reduction Neutralization test (PRNT) following a modified protocol by Morens et al (1985)¹² and according to WHO guidelines¹³. A positive result was considered when NAbs levels were $\geq 1:20$. The PRNT reciprocal dilution positivity was defined based on a 90% reduction in plaque counts (PRNT90).

We considered confirmed dengue cases those with positive detection for: 1) dengue NS1 antigen + anti-dengue IgM; 2) DENV RT-PCR; and for Zika those with positive for ZIKV RT-PCR¹⁴.

This research was approved by the Research Ethics Committee of the Medical School of the University of São Paulo (IRB no. 507/13, on January 6, 2014).

Between May 2015 and June 2019, six cases of dengue/Zika coinfection were confirmed. ZIKV RNA was detected by RT-PCR in all six cases (all in urine samples); DENV RNA was detected by RT-PCR in two of them and NS1Ag was detected in five cases. All cases were positive for dengue IgM. In cases with non-detected DENV RT-PCR, PRNT was performed and NAbs levels were between 1:40 to 1:1280 (DENV multityypical response). One case of negative dengue IgG prior to fever presented seroconversion (Table 1).

[Insert Table 1]

Table 2 presents a summary of the clinical presentation and laboratory results. The clinical outcomes were suggestive of a ZIKV infection in five patients, with early (first day or second day of symptom onset) diffuse pruritic maculopapular or morbilliform skin rash with low or short-term fever, when present. Additionally, conjunctivitis and joint edema were also observed in two cases. Case 4 was suggestive of dengue fever, with high fever and diffuse pruritic maculopapular skin rash on the fifth day of disease.

[Insert Table 2]

Our results are different from most of the similar case studies of co-infection published so far, in which a predominance of dengue clinical outcome was observed and, although not frequent, the possibility of alarm signs and the need for intravenous hydration existed^{4,5,7,8}. However, Lovine et al (2017)⁶ also found a clinical presentation suggestive of a Zika case, with no signs of severity warning.

No unexpected or other specific symptoms were observed. All cases had a mild presentation with general symptoms, with headache and myalgia observed in five cases; retroorbital pain in four cases; nausea in three cases; sore throat, mild abdominal pain and diarrhea in two cases; arthralgia and vomiting in one case.

Leukopenia has been described for both dengue and Zika cases and thrombocytopenia is more commonly described in dengue as compared to Zika^{9,14}. In co-infection cases, the predominance of leukopenia remained in our results and in other reported cases^{4,5,8}. Most reported cases of dengue/Zika coinfection had normal platelet

counts^{7,8}, as found in four cases in this study. However, two cases in our study presented thrombocytopenia. Similar outcome was observed in two cases reported by Dupont-Rouzeyrol (2015)⁴, as well as one of the cases reported by Chia (2017)⁵.

Cases of False-Positive Dengue NS1 Antigen in patients with Hematological Malignancies have been reported, but symptomatology and benign evolution with complete disappearance of symptoms within seven days were not compatible with such etiologies¹⁵. Gyurech et al. (2016)¹⁶ also described a false positive DENV NS1 antigen test result in a patient with an acute ZIKV infection, who was initially suspected for acute dengue fever. Unlike, Maurits et al. (2017)¹⁷, in a study conducted between 2015 and 2016, in blood samples of laboratory confirmed ZIKV-infected travelers, showed that none of the ZIKV RNA positive blood samples were cross-reactive in the DENV NS1 antigen ELISA. Similar results were published in a retrospective study (December 2015 to March 2016), in which the results did not show any DENV NS1 antigen cross-reactivity in RT-PCR confirmed acute ZIKV samples of French Guiana¹⁸. Guidelines consider the detection of NS1 antigen sufficient to confirm acute DENV infection^{9,14}. We found, in these six cases reported with detected ZIKV RT-PCR, four with undetected DENV RT-PCR. All four, in addition to detected NS1Ag, were also positive for dengue IgM and presented high titers of DENV neutralizing antibodies, showing the presence of infection by both viruses and not DENV NS1 antigen cross-reactivity in ZIKV RT-PCR detected cases.

Conclusions

The clinical and laboratory evolution of dengue/Zika co-infection cases is still unclear, especially regarding the severity of these cases. We found no serious clinical outcomes in coinfecting patients. Our results and the other published studies so far, demonstrated that a clinical diagnostic can be misleading. Cases of dengue/Zika co-infection may fulfill both the criteria of suspected dengue and Zika cases. In the absence of unique characteristics for co-infection cases, clinicians should be aware of the possibility of typical clinical presentations of both dengue and Zika in patients, emphasizing the importance of confirmatory laboratory tests for dengue and Zika.

We recognize that testing all suspected cases for both diseases is unfeasible, but a continuous specific laboratory confirmation for both Dengue and Zika viruses should be enforced as part of the surveillance systems even in the presence of very suggestive cases of dengue fever, minimizing the risk of a late detection of ZIKV circulation.

ZIKV infections have become an international concern because of their potential to cause microcephaly and other neurodevelopmental abnormalities that occur as a consequence of maternal infections¹⁹. Early detection of ZIKV circulation is paramount in generating alerts for the population, in order to prevent new cases of Congenital Zika Syndrome.

Referências

1. Simmons CP, Farrar JJ, Chau N van V, Wills B. Dengue. *N Engl J Med*. 2012;366:1423–32.
2. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49 de 2018. *Bol Epidemiológico* [Internet]. 2018;49(59):1–14. Available from: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/02/2018-067.pdf>
3. Donalisio MR, Freitas ARR, Zuben APB. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. *Rev Saude Publica*. 2016;50(36):1–7.
4. Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daures M, John M, Grangeon JP, et al. Co-infection with zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(2):381–2.
5. Chia PY, Yew H Sen, Ho H, Chow A, Sadarangani SP, Chan M, et al. Clinical features of patients with Zika and dengue virus co-infection in Singapore. *J Infect*. 2017;74(6):611–5.
6. Iovine NM, Lednický J, Cherabuddi K, Crooke H, White SK, Loeb JC, et al. Coinfection with zika and dengue-2 viruses in a traveler returning from Haiti, 2016: clinical presentation and genetic analysis. *Clin Infect Dis*. 2017;64(1):72–5.
7. Azeredo EL, dos Santos FB, Barbosa LS, Souza TMA, Badolato-Corrêa J, Sánchez-Arcila JC, et al. Clinical and laboratory profile of Zika and dengue infected patients: lessons learned from the co-circulation of dengue, Zika and chikungunya in Brazil. *PLoS Curr*. 2018;10:1–20.
8. Estofolete CF, Terzian ACB, Colombo TE, de Freitas Guimarães G, Ferraz HC, da Silva RA, et al. Co-infection between Zika and different Dengue serotypes during DENV outbreak in Brazil. *J Infect Public Health*. 2019;12(2):178–81.

9. Brasil. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. 3rd ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2019. 740 p. Available from:
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_volume_unico_3ed.pdf
10. Huhtamo E, Hasu E, Uzcátegui NY, Erra E, Nikkari S, Kantele A, et al. Early diagnosis of dengue in travelers: comparison of a novel real-time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology. *J Clin Virol.* 2010;47(1):49–53.
11. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(8):1232–9.
12. Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Raybourne N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol.* 1985;22(2):250–4.
13. Roehrig JT, Hombach J, Barrett ADT. Guidelines for plaque-reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. *Viral Immunol.* 2008;21(2):123–32.
14. Sharp TM, Fischer M, Muñoz-Jordán JL, Paz-Bailey G, Erin Staples J, Gregory CJ, et al. Dengue and zika virus diagnostic testing for patients with a clinically compatible illness and risk for infection with both viruses. *MMWR Recomm Reports.* 2019;68(1):1–10.
15. Chung SJ, Krishnan PU, Leo YS. Two cases of false-positive dengue non-structural protein 1 (NS1) antigen in patients with hematological malignancies and a review of the literature on the use of NS1 for the detection of dengue infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92(2):367–9.
16. Gyurech D, Schilling J, Schmidt-Chanasit J, Cassinotti P, Kaeppli F, Dobec M. False positive dengue NS1 antigen test in a traveller with an acute Zika virus infection imported into Switzerland. *Swiss Med Wkly.* 2016;146:w14296.
17. Van Meer MPA, Mögling R, Klaasse J, Chandler FD, Pas SD, van der Eijk AA, et al. Re-evaluation of routine dengue virus serology in travelers in the era of Zika virus emergence. *J Clin Virol.* 2017;92:25–31.

18. Matheus S, Boukhari R, Labeau B, Ernault V, Bremand L, Kazanji M, et al. Specificity of dengue NS1 antigen in differential diagnosis of dengue and zika virus infection. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(9):1691–3.
19. Sikka V, Chattu VK, Popli RK, Galwankar SC, Kelkar D, Sawicki SG, et al. The emergence of zika virus as a global health security threat: A review and a consensus statement of the INDUSEM Joint working Group (JWG). *J Glob Infect Dis.* 2016;8(1):3–15.

Tables

Table 1. Dengue and Zika specific diagnostic tests.

Specific tests	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6
Age (years)	6	9	13	17	29	40
Sex	Male	Male	Male	Male	Female	Female
DENV NS1Ag	+	+	+	-	+	+
DENV RT-PCR	-	-	-	+	+	-
DENV PRNT*	+	+	+	NT**	NT**	+
DENV IgM	+	+	+	+	+	+
Previous DEN IgG	+	-	+	+	+	+
Post infection DEN IgG	+	+	+	+	+	+
ZIKV RT-PCR***	+	+	+	+	+	+

* DENV PRNT90 title with values between 1:40 to 1:1280. ** NT: not tested.

*** Urine samples were collected at the following day after the onset of symptoms: case 1: 5; case 2: 3, case 3: 3; case 4: 5; case 5: 3; case 6: 14.

Table 2. Clinical and unspecific laboratory description of dengue/Zika coinfection cases in a Brazilian cohort, 2015-2019.

Clinical and laboratory data	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6
Skin rash	+ (early)	+ (early)	+ (early)	+ (late)	+ (early)	+ (early)
Type of rash	DPMP*	DPMB**	DPMP*	DPMP*	DPMP*	DPMP*
Headache	+	+	+	+	-	+
Retroorbital pain	-	+	-	+	+	+
Myalgia	+	-	+	+	+	+
Conjunctivitis	+	-	+	-	-	-
Sore throat	+	+	-	-	-	-
Mild abdominal pain	+	+	-	-	-	-
Arthralgia	-	-	-	-	-	+
Joint edema	-	-	-	-	+	+
Diarrhea	-	+	-	-	+	-
Nausea	-	+	+	-	-	+
Vomiting	-	+	-	-	-	-
Warning signs/hospitalization	-	-	-	-	-	-
Maximum tax (°C)/duration (days)	37.7/1	37.9/1	36,9	38.8/3	37.9/1.5	38.0/1.5
Leukocytes (cells/mm ³)	3,4	2,9	4,4	3	3,2	4,3
Platelets (cells/mm ³)	173	173	149	157	172	120

* Diffuse pruritic maculopapular. ** Diffuse pruritic morbilliform

04/02/2020

ScholarOne Manuscripts



Emerging Infectious Diseases

[Home](#)[Author](#)

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to

Emerging Infectious Diseases

Manuscript ID

EID-20-0202

Title

Six cases of Zika/dengue coinfection in a Brazilian cohort, 2015-2019

Authors

Siqueira, Claudio

Féres, Valéria

Loyola, Livia

Bento, Luziane

Montes, Larissa

Junqueira, Isabela

Siqueira, Joao

Date Submitted

04-Feb-2020

[Author Dashboard](#)

5 DISCUSSÃO

Nesse estudo descrevemos as estratégias para se implantar, conduzir e concluir um estudo prospectivo com duração de quatro anos no Brasil. Estudos de coorte apresentam desafios operacionais que restringem seu uso em países de média renda. Assim como o fizemos, Pedro *et al.* (2019) descreveram a complexidade da implementação de uma abrangente pesquisa prospectiva em áreas de grande assentamento urbano no Rio de Janeiro, Brasil, esclarecendo os principais obstáculos e facilitadores. A descrição e análise das experiências de campo em estudos de seguimento de acordo com a especificidade de cada região pode contribuir para o planejamento de futuras pesquisas semelhantes em outras localidades.

Também foram descritos e discutidos os aspectos sazonais das principais suspeitas diagnósticas dos casos febris durante o período do estudo. Por ter o clima um importante papel na transmissão de doenças transmissíveis que apresentam elevada morbimortalidade em países de baixa e média renda, a sazonalidade tem sido objeto de estudo por parte de gestores de saúde e pesquisadores a fim de se atenuar potenciais riscos à saúde humana (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2011).

Foi feita uma descrição e análise das características clínico-laboratoriais dos casos confirmados de dengue e Zika no estudo. Uma apresentação clínica de dengue, composta por sintomatologia mais leve, que não se enquadra nos critérios de casos suspeitos definidos pelo Ministério da Saúde do Brasil e que havia sido pouco discutida anteriormente na literatura, foi encontrada. Nesse estudo, algumas hipóteses explicativas para essa mudança na apresentação clínica em alguns casos de dengue, ocorrida principalmente em 2019, tais como uma possível influência nos sintomas de dengue determinada pela infecção prévia pelo ZIKAV e/ou a presença da sintomatologia incomum ser devida ao terceiro ou quarto episódio de dengue nesses casos, não evidenciaram associação positiva. Sabe-se que alguns genótipos do DENV-2 produzem quadros menos graves (ex: genótipo americano) e outros estão associados ao potencial de causar sintomas graves (ex: sudeste asiático do DENV-2) (COLOGNA; ARMSTRONG; RICO-HESSE, 2005), portanto uma possível associação seria a presença de um sorotipo menos virulento nos casos com menor acometimento do estado geral, sendo importante a realização da sorotipagem e da análise genotípica de casos semelhantes a esses. Evidências também sugerem que altas cargas virais durante a infecção por DENV estão associadas à uma sintomatologia mais intensa da doença (WILDER-SMITH *et al.*, 2019),

então, uma associação entre carga viral e apresentação clínica poderia ser encontrada. O rash cutâneo, na Zika, quando presente, surge no início da sintomatologia da doença (LIU *et al.*, 2017) e essa mesma característica esteve presente nos casos com apresentação clínica anusual de dengue nesse estudo. Barros *et al.* (2018) demonstraram que altos níveis de *Interferon Gamma-induced Protein 10* (IP10) em indivíduos infectados pelo ZIKV estavam fortemente associados com o exantema. Uma comparação entre os níveis de IP10 entre os casos com apresentação clínica usual e anusual de dengue poderia ser uma análise relevante.

Com relação à apresentação clínica de Zika, o sintoma guia elencado pela definição de caso suspeito do Ministério da Saúde (rash cutâneo pruriginoso) esteve ausente em quase 50% dos casos em nosso estudo, sendo o valor preditivo positivo de suspeita clínica dessa doença de 16,5%. Yan *et al.* (2018) sugeriram um critério diagnóstico de diferenciação clínica entre dengue e Zika e a presença do rash cutâneo não foi incluída nesse critério. A ausência do exantema pode dificultar a acurácia diagnóstica por parte dos clínicos, mas, devido o número de casos confirmados de Zika ser pequeno em nosso estudo, outras pesquisas com casuísticas maiores devem ser considerados para a melhor avaliação da sintomatologia dessa arbovirose. Caso se evidencie em novos estudos que o exantema pode não estar presente com a frequência de 90 a 100% dos casos de Zika conforme descrito pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2019), uma revisão sobre os critérios de definição de casos suspeitos dessa doença será relevante.

Com base nas séries de casos disponíveis (ESTOFOLETE *et al.*, 2018) e em nossos resultados, nenhuma característica clínica típica pode ser identificada como coinfeção dengue/Zika e os médicos devem estar cientes da possibilidade de apresentações clínicas de ambas nos casos de coinfeção, o que enfatiza a importância de testes laboratoriais confirmatórios para dengue e Zika.

6 CONCLUSÕES

A pesquisa de campo no Brasil tem sido desafiadora, pois a mentalidade científica ainda não está totalmente incorporada à sociedade. A parceria entre a academia e os serviços de saúde pode ser uma estratégia apropriada nessa perspectiva. A contribuição da equipe de gestão da Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia e das Equipes de Saúde da Família foi essencial para a correta implementação e condução deste estudo. Por outro lado, o desempenho dos pesquisadores favoreceu o Serviço de Saúde por meio de atividades de vigilância e atenção à saúde da população. Essa experiência interinstitucional foi bem-sucedida, com benefícios para ambas as instituições.

Descrições anteriores do perfil sazonal das IRA, pneumonia, dengue e Zika apresentaram concordância com nossos resultados. Novos estudos sobre a etiologia de DDA em Goiânia podem ajudar a entender sua sazonalidade nessa região. A compreensão desses perfis sazonais pode orientar ações de prevenção e planos de tratamento para essas doenças ao longo dos anos.

A sintomatologia dos casos de dengue e Zika podem se confundir e nem sempre se enquadram nas respectivas definições de casos suspeitos preconizadas pelo Ministério da Saúde. Mesmo reconhecendo o aumento do custo para a saúde pública de países que enfrentam inúmeros desafios como o Brasil, em áreas de co-circulação de DENV e ZIKV, o uso de testes laboratoriais específicos pode ser necessário para implementar adequadamente as ações de prevenção e manejo dessas doenças.

Os casos de coinfeção dengue/Zika podem atender aos critérios de definição propostos pelo Ministério da Saúde, tanto para a primeira doença, quanto para a segunda. Reconhecemos que a testagem de todos os casos suspeitos para ambas as doenças é inviável, mas uma confirmação laboratorial específica contínua para os vírus da dengue e Zika deve ser inserida como parte dos sistemas de vigilância, mesmo na presença de casos muito sugestivos de dengue, minimizando o risco de uma detecção tardia da circulação do ZIKV.

REFERÊNCIAS

- ABUBAKAR, S.; WONG, P. F.; CHAN, Y. F. Emergence of dengue virus type 4 genotype IIA in Malaysia. **The Journal of General Virology**, v. 83, n. Pt 10, p. 2437–42, out. 2002.
- AMARASINGHE, A.; MAHONEY, R. T. Estimating potential demand and supply of dengue vaccine in Brazil. **Human Vaccines**, v. 7, n. 7, p. 776–780, 2011.
- ANDERS, K. L.; NGUYET, N. M.; CHAU, N. V.; HUNG, N. T.; THUY, T. T.; LIEN LE, B., *et al.* Epidemiological factors associated with dengue shock syndrome and mortality in hospitalized dengue patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 1, p. 127–34, jan. 2011.
- ANVISA. **Anvisa registra primeira vacina contra dengue no Brasil**. 2015. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-registra-primeira-vacina-contra-dengue-no-brasil/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print%26_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=en_US. Acessado em: 10 jan. 2017.
- AÑEZ, G.; MORALES-BETOULLE, M. E.; RIOS, M. Circulation of different lineages of dengue virus type 2 in Central America, their evolutionary time-scale and selection pressure analysis. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27459, 2011.
- ARAÚJO, H.; CARVALHO, D. O.; IOSHINO, R. S.; COSTA-DA-SILVA, A. L.; CAPURRO, M. L. *Aedes aegypti* control strategies in Brazil: incorporation of new technologies to overcome the persistence of dengue epidemics. **Insects**, v. 6, n. 2, p. 576–594, 2015.
- ARAÚJO, J. M. G.; BELLO, G.; ROMERO, H.; NOGUEIRA, R. M. R. Origin and evolution of dengue virus type 3 in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, p. 1–10, 2012.
- ARAÚJO, T. V. B.; XIMENES, R. A. A.; MIRANDA-FILHO, D. B.; SOUZA, W. V.; MONTARROYOS, U. R.; DE MELO, A. P. L., *et al.* Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: final report of a case-control study. **Lancet Infectious Diseases**, v. 18, p. 328–336, 2018.
- ARRAGAIN, L.; DUPONT-ROUZEYROL, M.; O'CONNOR, O.; SIGUR, N.; GRANGEON, J.; HUGUON, E.; *et al.* Vertical transmission of dengue virus in the peripartum period and viral kinetics in newborns and breast milk: new data, *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, v. 6, n. 4, p. 324–331, 2017.
- AZEREDO, E. L.; DOS SANTOS, F. B.; BARBOSA, L. S.; SOUZA, T. M. A.; BADOLATO-CORRÊA, J.; SÁNCHEZ-ARCILA, J. C., *et al.* Clinical and laboratory profile of Zika and dengue infected patients: lessons learned from the co-circulation of dengue, Zika and chikungunya in Brazil. **PLoS Currents**, v. 10, p. 1–20, 2018.

- BALDACCHINO, F.; CAPUTO, B.; CHANDRE, F.; DRAGO, A.; DELLA TORRE, A.; MONTARSI, F., *et al.* Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. **Pest Management Science**, v. 71, n. 11, p. 1471–1485, 2015.
- BALMASEDA, A.; STANDISH, K.; MERCADO, J. C.; MATUTE, J. C.; TELLEZ, Y.; SABORÍO, S., *et al.* Trends in patterns of dengue transmission over 4 years in a pediatric cohort study in Nicaragua. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 1, p. 5–14, jan. 2010.
- BARCELLOS, C.; MONTEIRO, A. M. V.; CORVALÁN, C.; GURGEL, H. C.; CARVALHO, M. S.; ARTAXO, P., *et al.* Mudanças climáticas e ambientais e as doenças infecciosas: cenários e incertezas para o Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 18, n. 3, p. 285–304, 2009.
- BARONTI, C.; PIORKOWSKI, G.; CHARREL, R. N.; BOUBIS, L.; LEPARC-GOFFART, I.; DE LAMBALLERIE, X. Complete coding sequence of Zika virus from a French Polynesia outbreak in 2013. **Genome Announcements**, v. 2, n. 3, p. e00500-14, 2014.
- BARRETT, A. D. T. Current status of Zika vaccine development: Zika vaccines advance into clinical evaluation. **Nature Partner Journals Vaccines**, p. 1–4, 2018.
- BARROS, J. B. S.; DA SILVA, P. A. N.; KOGA, R. C. R.; GONZALEZ-DIAS, P.; FILHO, J. R. C.; NAGIB, P. R. A., *et al.* Acute Zika virus infection in an endemic area shows modest proinflammatory systemic immunoactivation and cytokine-symptom associations. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1–11, 2018.
- BESERRA, E. B.; CASTRO JÚNIOR, F. P. Biologia comparada de populações de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae) da Paraíba. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 1, p. 81–85, 2008.
- BESNARD, M.; EYROLLE-GUIGNOT, D.; GUILLEMETTE-ARTUR, P.; LASTÈRE, S.; BOST-BEZEAUD, F.; MARCELIS, L., *et al.* Congenital cerebral malformations and dysfunction in fetuses and newborns following the 2013 to 2014 Zika virus epidemic in French Polynesia. **Euro Surveillance**, v. 21, n. 13, p. 1–9, 2016.
- BHARUCHA, T.; BREUER, J. Review: a neglected Flavivirus: an update on Zika virus in 2016 and the future direction of research. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 42, p. 317–325, 2016.
- BHAT, V. G.; GETHING, P.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L., *et al.* Challenges in the laboratory diagnosis and management of dengue infections. **The Open Microbiology Journal**, v. 9, p. 33–37, 2015.
- BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L., *et al.* The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–7, 25 abr. 2013.
- BHATTACHARYA, M. K.; MAITRA, S.; GANGULY, A.; BHATTACHARYA, A.; SINHA, A. Dengue: a growing menace -- a snapshot of recent facts, figures and remedies. **International Journal of Biomedical Science**, v. 9, n. 2, p. 61–67, 2013.

BISSET LAZCANO, J. A.; MARQUETTI, M. C.; PORTILLO, R.; RODRÍGUEZ, M. M.; SUÁREZ, S.; LEYVA, M. Factores ecológicos asociados con la presencia de larvas de *Aedes aegypti* en zonas de alta infestación del municipio Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 19, n. 6, p. 379–384, 2006.

BONA, A. C. D.; TWERDOCHLIB, A. L.; NAVARRO-SILVA, M. A. Genetic diversity of dengue virus serotypes 1 and 2 in the State of Paraná, Brazil, based on a fragment of the capsid/premembrane junction region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 297–300, jun. 2012.

BOS, S.; GADEA, G.; DESPRES, P. Dengue: a growing threat requiring vaccine development for disease prevention prevention. **Pathogens and Global Health**, v. 112, n. 6, p. 294–305, 2018.

BRADY, O. J.; GETHING, P. W.; BHATT, S.; MESSINA, J. P.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G., *et al.* Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, p. e1760, jan. 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE **Guia de vigilância em saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 812 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DIRETORIA TÉCNICA DE GESTÃO. **Dengue diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança**. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 28 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. COORDENAÇÃO-GERAL DE DESENVOLVIMENTO DA EPIDEMIOLOGIA EM SERVIÇOS. **Guia de vigilância em saúde**. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 740 p.

BRASIL, P.; PEREIRA-JR., J. P.; MOREIRA, E.; NOGUEIRA, R. M. R.; DAMASCENO, L.; WAKIMOTO, M., *et al.* Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro — preliminary report. **The New England Journal of Medicine**, p. 1–11, 2016.

BURKE, D. S.; NISALAK, A.; JOHNSON, D. E.; SCOTT, R. M. A prospective study of dengue infections in Bangkok. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 38, n. 1, p. 172–180, jan. 1988.

CAO-LORMEAU, V. M.; ROCHE, C.; TEISSIER, A.; ROBIN, E.; BERRY, A. L.; MALLET, H. P., *et al.* Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 1085–1086, 2014.

CARNEIRO, A. R.; CRUZ, A. C.; VALLINOTO, M.; MELO, D. D. E. V.; RAMOS, R. T.; MEDEIROS, D. B., *et al.* Molecular characterisation of dengue virus type 1 reveals lineage replacement during circulation in Brazilian territory. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 805–812, 2012.

CARROLL, I. D.; TOOVEY, S.; VAN GOMPEL, A. Dengue fever and pregnancy - a review and comment. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 5, n. 3, p. 183–8, maio 2007.

- CARVALHO, D. O.; MCKEMEY, A. R.; GARZIERA, L.; LACROIX, R.; DONNELLY, C. A.; ALPHEY, L., *et al.* Suppression of a field population of *Aedes aegypti* in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p. 1–15, 2015.
- CAUCHEMEZ, S.; BESNARD, M.; BOMPARD, P.; DUB, T.; GUILLEMETTE-ARTUR, P.; EYROLLE-GUIGNOT, D., *et al.* Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–2015: a retrospective study. **Lancet**, v. 387, n. 10033, p. 2125–2132, 2016.
- CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. DIVISION OF VECTOR-BORNE DISEASES. **Revised diagnostic testing for Zika, chikungunya, and dengue viruses in US Public Health Laboratories**. 2016 Disponível em: <http://www.idahoperinatal.org/documents/CDC-zika-testing-algorithm.pdf>. Acessado em: 25 ago. 2018.
- CHAO, D. Y.; DAVIS, B. S.; CHANG, G. J. J. Development of multiplex real-time reverse transcriptase PCR assays for detecting eight medically important flaviviruses in mosquitoes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 584–589, 2007.
- CHEN, L. H.; WILSON, M. E. Update on non-vector transmission of dengue : relevant studies with Zika and other flaviviruses. **Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines**, v. 2, n. 15, p. 1–6, 2016.
- CHEN, R.; VASILAKIS, N. Dengue-Quo tu et quo vadis? **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1562–1608, 2011.
- CHIA, P. Y.; YEW, H. S.; HO, H.; CHOW, A.; SADARANGANI, S. P.; CHAN, M., *et al.* Clinical features of patients with Zika and dengue virus co-infection in Singapore. **Journal of Infection**, v. 74, n. 6, p. 611–615, 2017.
- COELHO, G. E. Challenges in the control of *Aedes aegypti*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54 Suppl 1, n. 1, p. S13-4, out. 2012.
- COELHO, G. E.; LEAL, P. L.; CERRONI, M. P.; SIMPLICIO, A. C.; SIQUEIRA-JR., J. B. Sensitivity of the dengue surveillance system in Brazil for detecting hospitalized cases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. 1–12, 2016.
- COLOGNA, R.; ARMSTRONG, P. M.; RICO-HESSE, R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. **Journal of Virology**, v. 79, n. 2, p. 853–859, 2005.
- DESCLOUX, E.; CAO-LORMEAU, V.; ROCHE, C.; DE LAMBALLERIE, X. Dengue 1 diversity and microevolution, French Polynesia 2001-2006: connection with epidemiology and clinics. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 8, p. e493, 2009.
- DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. Arboviroses emergentes no Brasil : desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 30, p. 10–15, 2017.

DUPONT-ROUZEYROL, M.; O'CONNOR, O.; CALVEZ, E.; DAURES, M.; JOHN, M.; GRANGEON, J. P., *et al.* Co-infection with zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 381–382, 2015.

DUSSART, P.; BARIL, L.; PETIT, L.; BENIGUEL, L.; QUANG, L. C.; LY, S., *et al.* Clinical and virological study of dengue cases and the members of their households: the multinational DENFRAME project. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, p. e1482, 2012.

ENDY, T. P.; ANDERSON, K. B.; NISALAK, A.; YOON, I.; GREEN, S.; ROTHMAN, A. L., *et al.* Determinants of inapparent and symptomatic dengue infection in a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. e975, 2011.

ENDY, T. P.; CHUNSUTTIWAT, S.; NISALAK, A.; LIBRATY, D. H.; GREEN, S.; ROTHMAN, A. L., *et al.* Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. **American Journal of Epidemiology**, v. 156, n. 1, p. 40–51, 2002.

ENDY, T. P.; YOON, I. K.; MAMMEN, M. P. Prospective cohort studies of dengue viral transmission and severity of disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 338, p. 1–13, 2010.

ESTOFOLETE, C. F.; TERZIAN, A. C. B.; COLOMBO, T. E.; DE FREITAS GUIMARÃES, G.; FERRAZ, H. C.; DA SILVA, R. A., *et al.* Co-infection between Zika and different dengue serotypes during DENV outbreak in Brazil. **Journal of Infection and Public Health**, v. 12, n. 2, p. 178–181, 2019.

FANTINATO, F. F. S. T.; ARAÚJO, E. L. L.; RIBEIRO, I. G.; ANDRADE, M. R.; DANTAS, A. L. M.; RIOS, J. M. T., *et al.* Descrição dos primeiros casos de febre pelo vírus Zika investigados em municípios da região Nordeste do Brasil, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, p. 1–8, 2016.

FARIA, N. R.; AZEVEDO, R.; KRAEMER, M.; SOUZA, R.; CUNHA, M. S.; HILL, S. C., *et al.* Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 345–349, 2016.

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. The perpetual challenge of infectious diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 5, n. 366, p. 454–461, 2012.

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika virus in the Americas — yet another arbovirus threat. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 7, p. 601–604, 2016.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **First FDA-approved vaccine for the prevention of dengue disease in endemic regions**. 2019. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/first-fda-approved-vaccine-prevention-dengue-disease-endemic-regions>. Acessado em: 9 ago. 2019.

FERES, V. C. R.; MARTELLI, C. M.; TURCHI, M. D.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. B.; NOGUEIRA, R. M.; ROCHA, B. A., *et al.* Laboratory surveillance of dengue virus in Central Brazil, 1994–2003. **Journal of Clinical Virology**, v. 37, n. 3, p. 179–183, 2006.

FERNÁNDEZ-SALAS, I.; DANIS-LOZANO, R.; CASAS-MARTÍNEZ, M.; ULLOA, A.; BOND, J. G.; MARINA, C. F., *et al.* Historical inability to control *Aedes aegypti* as a main contributor of fast dispersal of chikungunya outbreaks in Latin America. **Antiviral Research**, v. 124, p. 30–42, 2015.

FIGUEIREDO, L. T. M. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. **Medicina**, v. 32, n. jan/mar, p. 15–20, 1999.

FOCKS, D. A.; HAILE, D. G.; DANIELS, E.; MOUNT, G. A. Dynamic life table model for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): analysis of the literature and model development. **Journal of Medical Entomology**, v. 30, n. 6, p. 1003–17, nov. 1993.

FORSHEY, B. M.; REINER, R. C.; OLKOWSKI, S.; MORRISON, A. C.; ESPINOZA, A.; LONG, K. C., *et al.* Incomplete protection against dengue virus type 2 re-infection in Peru. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004398, 2016.

GARCIA, L. P. **Epidemia do vírus Zika e microcefalia no Brasil: emergência, evolução e enfrentamento - Texto para discussão**. p. 61, 2368. 2018. Disponível em: <http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/8282/1/td_2368.pdf>. Acessado em 7 jul 2019.

GOIÂNIA. Informe técnico semanal: dengue, chikungunya, zika e microcefalia relacionada à infecção pelo vírus zika. **Informe Técnico Semanal**, v. 324, p. 1–6, 2016.

GOIÂNIA. Informe técnico semanal: dengue, chikungunya e zika. **Informe Técnico Semanal**, v. 9, p. 1–4, 2017.

GOIÂNIA. Informe técnico semanal: dengue, chikungunya e zika. **Informe Técnico Semanal**, v. 17, p. 1–4, 2019a.

GOIÂNIA. Informe técnico semanal: dengue, chikungunya e zika. **Informe Técnico Semanal**, v. 52, p. 1–5, 2019b.

GÓMEZ-DANTÉS, H.; WILLOQUET, J. R. Dengue in the Americas: challenges for prevention and control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25 Suppl 1, p. S19-31, jan. 2009.

GONCALVEZ, A. P.; ESCALANTE, A. A.; PUJOL, F. H.; LUDERT, J. E.; TOVAR, D.; SALAS, R. A.; LIPRANDI, F. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. **Virology**, v. 303, p. 110–119, 2002.

GORSHKOV, K.; SHIRYAEV, S. A.; FERTEL, S.; LIN, Y. W.; HUANG, C. T.; PINTO, A., *et al.* Zika Virus: origins, pathological action, and treatment strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 3252, p. 1–17, 2019.

GUBLER, D. J. Dengue, urbanization and globalization: the unholy trinity of the 21(st) century. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4 Suppl, p. 3–11, dez. 2011.

GUILARDE, A. O.; TURCHI, M. D.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. B.; FERES, V. C.; ROCHA, B.; LEVI, J. E., *et al.* Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 6, p. 817–824, 2008.

- GUTIERREZ, G.; STANDISH, K.; NARVAEZ, F.; PEREZ, M. A.; SABORIO, S.; ELIZONDO, D., *et al.* Unusual dengue virus 3 epidemic in Nicaragua, 2009. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 11, p. e1394, 2011.
- GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER, D. J., *et al.* Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7-16, dez. 2010.
- GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **The Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 453–465, jan. 2015.
- GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Advances in dengue diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, n. 6, p. 621–627, 1996.
- GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. **Journal of Clinical Virology**, v. 27, n. 1, p. 1–13, maio 2003.
- GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 2, p. 69–80, 2004.
- GUZMÁN, M. G.; KOURI, G.; BRAVO, J. K.; VALDES, L.; VAZQUEZ, S.; HALSTEAD, S. B. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 6, n. 2, p. 118–24, jun. 2002.
- GYURECH, D.; SCHILLING, J.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; CASSINOTTI, P.; KAEPPEL, F.; DOBEC, M. False positive dengue NS1 antigen test in a traveller with an acute Zika virus infection imported into Switzerland. **Swiss Medical Weekly**, v. 146, n. February, p. w14296, 2016.
- HADINEGORO, S. R.; ARREDONDO-GARCÍA, J. L.; CAPEDING, M. R.; DESEDA, C.; CHOTPITAYASUNONDH, T.; DIETZE, R. *et al.* Efficacy and long-term safety of a dengue vaccine in regions of endemic disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 13, p. 1195–1206, set. 2015.
- HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 476–81, jan. 1988.
- HAMEL, R.; DEJARNAC, O.; WICHIT, S.; EKCHARIYAWAT, P.; NEYRET, A.; LUPLERTLOP, N., *et al.* Biology of zika virus infection in human skin cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 2015.
- HAMMOND, S. N.; BALMASEDA, A.; PÉREZ, L.; TELLEZ, Y.; SABORÍO, S. I.; MERCADO, J. C., *et al.* Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 6, p. 1063–70, dez. 2005.
- HARRIS, A. F.; MCKEMEY, A. R.; NIMMO, D.; CURTIS, Z.; BLACK, I.; MORGAN, S. A., *et al.* Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 9, p. 828–30, set. 2012.

HARRIS, E.; SANDOVAL, E.; XET-MULL, A. M.; JOHNSON, M.; RILEY, L. W. Rapid subtyping of dengue viruses by restriction site-specific (RSS)-PCR. **Virology**, v. 253, n. 1, p. 86–95, 1999.

HARRIS, E.; VIDEA, E.; PÉREZ, L.; SANDOVAL, E.; TÉLLEZ, Y.; PÉREZ, M. L., *et al.* Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, n. 1–2, p. 5–11, 2000.

HOFFMANN, A. A.; MONTGOMERY, B. L.; POPOVICI, J.; ITURBE-ORMAETXE, I.; JOHNSON, P. H.; MUZZI, F., *et al.* Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. **Nature**, v. 476, n. 7361, p. 454–457, ago. 2011.

HONORIO, N. A.; SILVA, W. C.; LEITE, P. J.; GONÇALVES, J. M.; LOUNIBOSIV, L. P.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 2, p. 191–198, 2003.

HUNG, N. T.; NGUYEN, T. L.; LEI, H. Y.; LIN, Y. S.; LE, B. L.; HUANG, K. J., *et al.* Association between sex, nutritional status, severity of dengue hemorrhagic fever, and immune status in infants with dengue hemorrhagic fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 4, p. 370–374, 2005.

HURTADO-DÍAZ, M.; RIOJAS-RODRÍGUEZ, H.; ROTHENBERG, S. J.; GOMEZ-DANTÉS, H.; CIFUENTES, E. Short communication: impact of climate variability on the incidence of dengue in Mexico. **Tropical Medicine & International Health**, v. 12, n. 11, p. 1327–37, nov. 2007.

IOVINE, N. M.; LEDNICKY, J.; CHERABUDDI, K.; CROOKE, H.; WHITE, S. K.; LOEB, J. C., *et al.* Coinfection with zika and dengue-2 viruses in a traveler returning from Haiti, 2016: clinical presentation and genetic analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 1, p. 72–75, 2017.

JESSIE, K.; FONG, M. Y.; DEVI, S.; LAM, S. K.; WONG, K. T. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 8, p. 1411–1418, 2004.

JESUS, J. G.; DUTRA, K. R.; SALLES, F. C. S.; CLARO, I. M.; TERZIAN, A. C.; CANDIDO, D. S.; *et al.* Early identification of dengue virus lineage replacement in Brazil using portable genomic surveillance. **bioRxiv**. 716159; doi: <https://doi.org/10.1101/716159>

KHOR, C. C.; BICH, C. T. N.; PANG, J.; DAVILA, S.; LONG, H. T.; ONG, R. T. H., *et al.* Genome-wide association study identifies susceptibility loci for dengue shock syndrome at MICB and PLCE1. **Nature Genetics**, v. 43, n. 11, p. 1139–1141, 2012.

KUNO, G.; CHANG, G. J.; TSUCHIYA, K. R.; KARABATSOS, N.; CROPP, C. B. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. **Journal of Virology**, v. 72, n. 1, p. 73–83, 1998.

- LANCIOTTI, R. S.; KOSOY, O. L.; LAVEN, J. J.; VELEZ, J. O.; LAMBERT, A. J.; JOHNSON, A. J., *et al.* Genetic and serologic properties of zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.
- LANCIOTTI, R. S.; LEWIS, J. G.; GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. **The Journal of General Virology**, v. 75, n. (Pt 1), p. 65–75, jan. 1994.
- LIMA, M. R. Q.; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G.; FILIPPIS, A. M. B.; LIMONTA, D.; SANTOS, F. B. A new approach to dengue fatal cases diagnosis: NS1 antigen capture in tissues. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 5, p. e1147, 2011.
- LIMA, M. R. Q.; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G.; SANTOS, F. B. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 7, p. 1–8, 2010.
- LIU, L. E.; DEHNING, M.; PHIPPS, A.; SWIENTON, R. E.; HARRIS, C. A.; KLEIN, K. R. Clinical update on dengue, chikungunya, and Zika: what we know at the time of article submission. **Disaster Medicine and Public Health Preparedness**, v. 11, n. 3, p. 290–299, 2017.
- LOBO, M. R. G.; FURTADO, S. C.; GALVÃO JÚNIOR, J. R.; PAULA, L. de; BARCELLOS, J. F. M. Citocinas na dengue : inovações do sistema imune. **Scientia Amazonia**, v. 3, n. 1, 25-40, jan-abr, 2014.
- MACIEL-DE-FREITAS, R.; MARQUES, W. A.; PERESI, R. C.; CUNHA, S. P.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Variation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) container productivity in a slum and a suburban district of Rio de Janeiro during dry and wet seasons. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 4, p. 489–496, jun. 2007.
- MACIEL, I. J. **Avaliação epidemiológica do dengue no município de Goiânia no período de 1994 a 1997**. 1999. Universidade Federal de Goiás, 1999.
- MACIEL, I. J.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. B.; MARTELLI, C. M. T. Epidemiologia e desafios no controle do dengue. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 2, p. 111–130, 2009.
- MACNAMARA, F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954.
- MAMMEN, M. P.; PIMGATE, C.; KOENRAADT, C. J. M.; ROTHMAN, A. L.; ALDSTADT, J.; NISALAK, A., *et al.* Spatial and temporal clustering of dengue virus transmission in Thai villages. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 11, p. 1605–1616, 2008.
- MARCHETTE, N. J.; GARCIA, R.; RUDNICK, A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, n. 3, p. 411–415, 1969.

- MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 564–81, out. 2009.
- MATHEUS, S.; BOUKHARI, R.; LABEAU, B.; ERNAULT, V.; BREMAND, L.; KAZANJI, M., *et al.* Specificity of dengue NS1 antigen in differential diagnosis of dengue and zika virus infection. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 9, p. 1691–1693, 2016.
- MEDEIROS, L. C. C. M.; CASTILHO, C. A. R.; BRAGA, C.; SOUZA, W. V.; REGIS, L.; MONTEIRO, A. M. V. Modeling the dynamic transmission of dengue fever: investigating disease persistence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 1, e942, p. 1-14, 2011.
- MEDRONHO, R. de A. Dengue e o ambiente urbano. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 9, n. 2, p. 159–161, jun. 2006.
- MELTZER, M. I.; RIGAU-PÉREZ, J. G.; CLARK, G. G.; REITER, P.; GUBLER, D. J.. Using disability-adjusted life years to assess the economic impact of dengue in Puerto Rico: 1984-1994. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 2, p. 265–271, 1998.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe epidemiológico da dengue Semanas de 1 a 52 de 2009. **Informe Epidemiológico**, p. 1–28, 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Casos de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2013**. 2014. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/31/Dengue-classica-at---2013.pdf>. Acessado em: 7 abr. 2018.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49 de 2018. **Boletim Epidemiológico**, v. 49, n. 1, p. 1–14, 2018a.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2017. **Boletim Epidemiológico**, v. 49, n. 2, p. 1–13, 2018b.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 49 **Boletim Epidemiológico**, v. 50, n. 38, p. 28–35, 2019.
- MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 487–524, 2016.
- MUSTAFA, M. S.; RASOTGI, V.; JAIN, S.; GUPTA, V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p. 67–70, 2015.

NOGUEIRA, R. M. R.; ZAGNER, S. M. O.; MARTINS, I. S. M.; LAMPE, E.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 2, p. 269–269, jun. 1991.

NOORBAKHS, F.; ABDOLMOHAMMADI, K.; FATAHI, Y.; DALILI, H.; RASOOLINEJAD, M.; REZAEI, F., *et al.* Zika virus infection, basic and clinical aspects : a review article. **Iran Journal of Public Health**, v. 48, n. 1, p. 20–31, 2019.

NORMILE, D. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. **Science**, v. 342, n. 6157, p. 415, 2013.

NUNES, M. R. T.; FARIA, N. R.; VASCONCELOS, H. B.; MEDEIROS, D. B. DE A.; LIMA, C. P. S. DE; CARVALHO, V. L., *et al.* Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010–2011. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. 1858–1864, 2012.

OLIVEIRA, C. S. de; VASCONCELOS, P. F. da C. Microcephaly and Zika virus. **Jornal de Pediatria**, v. 92, n. 2, p. 103–105, 2016.

OSANAI, C. H. **A epidemia de dengue em Boa Vista, território Federal de Roraima, 1981-1982**. 1984. Escola Nacional de Saúde Pública, 1984.

PAHO - PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Epidemiological Alert: Dengue. 21 Junio 2013**, Washington, D.C.:AHO/WHO; 2013. Disponível em: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50715/EpiUpdate21June2013_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acessado em 3 dez. 2018.

PAHO - PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **PLISA – Plataforma de Informacion en Salud de las Americas: dengue y dengue grave**. 2017. Disponível em: <http://www.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/dengue-nacional/9-dengue-pais-ano.html>. Acessado em 3 dez. 2019.

PAHO - PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Epidemiological Update: Dengue. 11 November 2019**, Washington, D.C. PAHO / WHO. 2019. Disponível em: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=dengue-2217&alias=50963-11-november-2019-dengue-epidemiological-update-1&Itemid=270&lang=en. Acessado em 10 jan 2020.

PAL, S.; DAUNER, A. L.; MITRA, I.; FORSHEY, B. M.; GARCIA, P.; MORRISON, A. C., *et al.* Evaluation of dengue NS1 antigen rapid tests and ELISA kits using clinical samples. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e113411, 2014.

PANG, T.; MAK, T. K.; GUBLER, D. J. Dengue 2: prevention and control of dengue—the light at the end of the tunnel. **Lancet Infectious Disease**, v. 17, p. e79-87, 2017.

PEDRAZA, D. F.; QUEIROZ, D. de; SALES, M. C. Doenças infecciosas em crianças pré-escolares brasileiras assistidas em creches. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 2, p. 511–528, 2014.

- PEDRO, R. S.; CARVALHO, M. S.; GIRIANELLI, V. R.; DAMASCENO, L. S.; LEAL, I.; DA CUNHA, D. C., *et al.* A populational-based birth cohort study in a low-income urban area in Rio de Janeiro, Brazil: Implementation and description of the characteristics of the study. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 35, n. 5, p. e00023918, 2019.
- PEREZ, F.; LLAU, A.; GUTIERREZ, G.; BEZERRA, H.; COELHO, G.; AULT, S., *et al.* The decline of dengue in the Americas in 2017: discussion of multiple hypotheses. **Tropical Medicine and International Health**, v. 24, n. 4, p. 442–453, 2019.
- PORTER, K. R.; BECKETT, C. G.; KOSASIH, H.; TAN, R. I.; ALISJAHBANA, B.; RUDIMAN, P. I., *et al.* Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever in a cohort of adults living in Bandung, West Java, Indonesia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 1, p. 60–6, jan. 2005.
- PROMPETCHARA, E.; KETLOY, C.; THOMAS, S. J.; RUXRUNGTHAM, K. Dengue vaccine: global development update. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, p. 1–8, 2019.
- RASMUSSEN, S. A.; JAMIESON, D. J.; HONEIN, M. A.; PETERSEN, L. R. Zika virus and birth defects — reviewing the evidence for causality. **The New England Journal of Medicine**, p. 1–7, 2016.
- RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue viruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 315–341, 2003.
- RICO-HESSE, R.; HARRISON, L. M.; SALAS, R. A.; TOVAR, D.; NISALAK, A.; RAMOS, C., *et al.* Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, v. 230, n. 2, p. 244–51, 14 abr. 1997.
- RIVERA, A. H.; RODRÍGUEZ, A. P. Actualización en aspectos epidemiológicos y clínicos del dengue. **Revista Cubana Salud Pública**, v. 36, n. 1, p. 149–164, 2010.
- RUDAN, I.; O'BRIEN, K. L.; NAIR, H.; LIU, L.; THEODORATOU, E.; QAZI, S., *et al.* Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative pathogens for 192 countries. **Journal of Health Global**, v. 3, n. 1, p. 1–14, 2013.
- RUEDA, L. M. PATEL, K. J.; AXTELL, R. C.; STINNER, R. E. Temperature-dependent development and survival rates of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 27, n. 5, p. 892–8, set. 1990.
- SAN MARTÍN, J. L.; BRATHWAITE, O.; ZAMBRANO, B.; SOLÓRZANO, J. O.; BOUCKENOOGHE, A.; DAYAN, G. H., *et al.* The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 1, p. 128–35, jan. 2010.
- SARTI, E.; L'AZOU, M.; MERCADO, M.; KURI, P.; SIQUEIRA-JR, J. B.; SOLIS, E., *et al.* A comparative study on active and passive epidemiological surveillance for dengue in five Latin America countries. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 44, p. 44–49, 2016.

- SCHNEIDER J; DROLL D. A time line for dengue in the Americas to December 31, 2000 and Noted First Occurrences. Washington, DC: Pan American Health Organization; 2001. Disponível em: www.paho.org/English/HCP/HCT/VBD/dengue_finaltime.doc. Acessado em: 7 jul. 2018
- SENEVIRATNE, S. L.; MALAVIGE, G. N.; DE SILVA, H. J. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 7, p. 608–614, jul. 2006.
- SHEPARD, D. S.; COUDEVILLE, L.; HALASA, Y. A.; ZAMBRANO, B.; DAYAN, G. H. Economic impact of dengue illness in the Americas. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 200–207, 2011.
- SHEPARD, D. S.; SUAYA, J. A.; HALSTEAD, S. B.; NATHAN, M. B.; GUBLER, D. J.; MAHONEY, R. T., *et al.* Cost-effectiveness of a pediatric dengue vaccine. **Vaccine**, v. 22, n. 9–10, p. 1275–80, 12 mar. 2004.
- SHU, P. Y.; CHEN, L. K.; CHANG, S. F.; YUEH, Y. Y.; CHOW, L.; CHIEN, L. J., *et al.* Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 4, p. 622–30, jul. 2003.
- SIKKA, V.; CHATTU, V. K.; POPLI, R. K.; GALWANKAR, S. C.; KELKAR, D.; SAWICKI, S. G. *et al.* The emergence of Zika virus as a global health security threat: a review and a consensus statement of the INDUSEM Joint Working Group (JWG). **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 3–15, 2016.
- SILVA FILHO, E. B.; SILVA, A. L.; SANTOS, A. O.; DALLACQUA, D. S. V.; SOUZA, L. F. B. Infecções respiratórias de importância clínica : uma revisão Sistemática. **Revista das Faculdades Integradas Aparício Carvalho**, v. 4, n. 1, p. 7–16, 2017.
- SILVA, H. H.; SILVA, I. G. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 349–355, 1999.
- SILVA JÚNIOR, J. L. R.; PADILHA, T. F.; REZENDE, J. E.; RABELO, E. C. A.; FERREIRA, A. C. G.; RABAHI, M. F. Efeito da sazonalidade climática na ocorrência de sintomas respiratórios em uma cidade de clima tropical. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 37, n. 6, p. 759–767, 2011.
- SIMMONS, C. P.; FARRAR, J. J.; CHAU, N. VAN V.; WILLS, B. Dengue. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, p. 1423–1432, 2012.
- SIQUEIRA-JÚNIOR, J. B.; MARTELLI, C. M.; MACIEL, I. J.; OLIVEIRA, R. M.; RIBEIRO, M. G.; AMORIM, F. P., *et al.* Household survey of dengue infection in central Brazil: spatial point pattern analysis and risk factors assessment. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 5, p. 646–651, 2004.

SIRIVICHAYAKUL, C.; LIMKITTIKUL, K.; CHANTHAVANICH, P.; JIWARIYAVEJ, V.; CHOKEJINDACHAI, W.; PENGSA, K., *et al.* Dengue infection in children in Ratchaburi, Thailand: A cohort study. ii. clinical manifestations. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, 2012.

SRIDHAR, S.; LUEDTKE, A.; LANGEVIN, E.; ZHU, M.; BONAPARTE, M.; MACHABERT, T., *et al.* Effect of dengue serostatus on dengue vaccine safety and efficacy. **The New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 4, p. 327–340, 2018.

STANAWAY, J. D.; SHEPARD, D. S.; UNDURRAGA, E. A.; HALASA, Y. A.; COFFENG, L. E.; BRADY, O. J., *et al.* The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3099, n. 16, p. 1–12, 2016.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. Suplemento, p. S99–S102, 2001.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 867–871, 2002.

TAYLOR-ROBINSON, A. W. A putative fifth serotype of dengue - potential implications for diagnosis, therapy and vaccine design. **International Journal of Clinical & Medical Microbiology**, v. 1, n. 101, p. 1–2, 2016.

TEIXEIRA, M. G.; Siqueira-Jr, J. B., Ferreira, G. L. C.; Bricks, L.; Joint, G. Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000-2010): a systematic literature search and analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, p. e2520, jan. 2013.

TEMPORÃO, J. G.; PENNA, G. O.; CARMO, E. H.; COELHO, G. E.; AZEVEDO R. DO S. S.; NUNES, M. R. T., *et al.* Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 938–940, 2011.

TOGNARELLI, J.; ULLOA, S.; VILLAGRA, E.; LAGOS, J.; AGUAYO, C.; FASCE, R., *et al.* A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. **Archives of Virology**, v. 161, p. 665–668, 2016.

TORRES, J. R.; FALLEIROS-ARLANT, L. H.; GESSNER, B. D.; DELRIEU, I.; AVILA-AGUERO M. L.; GIAMBERNARDINO, H. I. G.; *et al.* Updated recommendations of the International Dengue Initiative expert group for CYD-TDV vaccine implementation in Latin America. **Vaccine**, v. 37, n. 43, p. 6291–6298, 2019.

TWIDDY, S. S.; FARRAR, J. J.; VINH CHAU, N.; WILLS, B.; GOULD, E. A.; GRITSUN, T., *et al.* Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. **Virology**, v. 298, n. 1, p. 63–72, jun. 2002.

VAN MEER, M. P. A.; MÖGLING, R.; KLAASSE, J.; CHANDLER, F. D.; PAS, S. D.; VAN DER EIJK, A. A., *et al.* Re-evaluation of routine dengue virus serology in travelers in the era of Zika virus emergence. **Journal of Clinical Virology**, v. 92, n. February, p. 25–31, 2017.

- VERHAGEN, L. M.; GROOT, R. Dengue in children. **Journal of Infection**, v. 69, n. S1, p. S77–S86, 2014.
- VILLAR, L.; DAYAN, G. H.; ARREDONDO-GARCÍA, J. L.; RIVERA, D. M.; CUNHA, R.; DESEDA, C., *et al.* Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 2, p. 113–123, 2014.
- VONG, S.; KHIEU, V.; GLASS, O.; LY, S.; DUONG, V.; HUUY, R., *et al.* Dengue incidence in urban and rural Cambodia: results from population-based active fever surveillance, 2006-2008. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 11, p. e903, jan. 2010.
- WALDMAN, E. A.; SATO, A. P. S. Trajetória das doenças infecciosas no Brasil nos últimos 50 anos : um contínuo desafio. **Revista de Saúde Pública**, p. 50–69, 2016.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diarrhoea: why children are still dying and what can be done**. Geneva: WHO, 2009a. 68 p.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. Geneva: WHO. 2009b. 409 p.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020**. Geneva: WHO. 42 p. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/75303/9789241504034_eng.pdf?sequence=1. Acessado em: 15 set. 2018.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Ending preventable child deaths from pneumonia and diarrhoea by 2025 The integrated Global Action Plan for Pneumonia and Diarrhoea (GAPPD)**. Geneva: World Health Organization, 2013. 64 p.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue vaccine: WHO position paper, September 2018 – Recommendations. **Vaccine**, v. 37, n. 2019, p. 4848–4849, 2018.
- WILDER-SMITH, A. OOI, E. E.; HORSTICK, O.; WILLS, B. Dengue. **The Lancet**, v. 393, n. 10169, p. 350–363, 2019.
- WILSON, M. E.; CHEN, L. H. Dengue in the Americas: history of dengue in the Americas. **Dengue Bulletin**, v. 26, n. 1, p. 44–61, 2002.
- WITTKE, V.; ROBB, T. E.; THU, H. M.; NISALAK, A.; NIMMANNITYA, S.; KALAYANROOJ, S., *et al.* Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. **Virology**, v. 301, n. 1, p. 148–56, set. 2002.
- YAMASHITA, A.; SASAKI, T.; KUROSU, T.; YASUNAGA, T.; IKUT, K. Origin and distribution of divergent dengue virus: novel database construction and phylogenetic analyses. **Future Virology**, v. 8, n. 11, p. 1061–1083, nov. 2013.
- YAN, G.; PANG, L.; COOK, A. R.; HO, H. J.; WIN, M. S.; KHOO, A. L., *et al.* Distinguishing zika and dengue viruses through simple clinical assessment, Singapore. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 8, p. 1565–1568, 2018.

YOKSAN, S.; TUBTHONG, K.; KANITWITHAYANUN, W.; JIRAKANJANAKIT, N. Laboratory assays and field dengue vaccine evaluation at Ratchaburi province, Thailand: a preliminary result. **Journal of Clinical Virology**, v. 46, n. Suppl. 2, p. S13–S15, 2009.

ZAGNE, S. M.; ALVES, V. G.; NOGUEIRA, R. M.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LAMPE, E.; TAVARES, W. Dengue haemorrhagic fever in the state of Rio de Janeiro, Brazil: a study of 56 confirmed cases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 6, p. 677–9, 1994.

ZANLUCA, C.; MELO, V. C. A.; MOSIMANN, A. L. P.; SANTOS, G. I. V.; SANTOS, C. N. D.; LUZ, KLEBER. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, jun. 2015.

ZARA, A. L. S. A.; SANTOS, S. M.; FERNANDES-OLIVEIRA, E. S.; CARVALHO, R. G.; COELHO, G. E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 1–2, 2016.

ANEXOS

ANEXO A. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: ESTUDO DA INCIDÊNCIA DA DENGUE NO BRASIL EM MUNICIPIOS DE ALTA E MÉDIA ENDEMICIDADE: GOIÂNIA-GO E ARARAQUARA-SP
Pesquisador Responsável: Claudio Sérgio Pannuti **Versão:** 4
CAAE: 25706913.6.0000.0065
Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Co-Participante

DADOS DO PARECER

Data da Relatoria: 08/01/14 - *ad referendum*

Apresentação do Projeto: Trata-se de um projeto com coleta e análise de sangue em populações de cidades com média e alta incidência de Dengue. O projeto está apresentado de forma correta, bem justificado com amplo suporte bibliográfico. Os materiais e métodos são apresentados em detalhe e parecem adequados ao tipo de pesquisa.

Objetivo da Pesquisa: O projeto pretende descrever o perfil sorológico e status imunológico da população antes de uma possível estratégia futura de vacinação e identificar a proporção de casos assintomáticos, oligossintomáticos e o perfil clínico dos casos sintomáticos e seu status sorológico. O projeto pretende também identificar os fatores de risco para dengue grave, segundo faixa etária e fornecer os dados epidemiológicos necessários à modelagem da dinâmica de transmissão da dengue em distintos cenários epidemiológicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Já analisados pelo CEP da instituição proponente

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Sem pendências éticas

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Nenhuma. O projeto está sendo encaminhado para análise deste CAPPesq tendo em vista que as amostras serão processadas no LIM 52 e já consta anuência do mesmo.

Situação do Parecer: Aprovado.

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e