



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Lucas Rodrigues de Carvalho

Análise da presença do Zika vírus em pacientes sintomáticos e sem sintomas
clínicos para arboviroses

São José do Rio Preto

2019

Lucas Rodrigues de Carvalho

Análise da presença do Zika vírus em pacientes sintomáticos e sem sintomas clínicos para arboviroses

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora CNPq – Proc. 131910/2017-5

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Rahal

Coorientadoras: Prof^a. Dr^a. Cintia Bittar Oliva

Prof^a. Dr^a. Marília de Freitas Calmon Saiki

São José do Rio Preto

2019

C331a

Carvalho, Lucas Rodrigues de

Análise da presença de Zika vírus em pacientes sintomáticos e sem sintomas clínicos para arboviroses / Lucas Rodrigues de Carvalho. -- São José do Rio Preto, 2019

76 f. : il., tabs., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Paula Rahal

1. Virologia. 2. Genética Molecular. 3. Zika vírus. 4. Diagnóstico. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Lucas Rodrigues de Carvalho

Análise da presença do Zika vírus em pacientes sintomáticos e sem sintomas
clínicos para arboviroses

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora CNPq – Proc 131910/2017-5

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Paula Rahal
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Profa. Dra. Cassia Fernanda Estofolete
FAMERP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Ricardo Barros Mariutti
UNESP – Câmpus de Rio Claro

São José do Rio Preto
25 de fevereiro de 2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Carla e Antonio, e a minha irmã, Luana, que nunca mediram esforços, amor e tempo, e sempre estiveram presentes em todas as alegrias da minha vida. As pessoas com quem compartilho felicidades, prazeres e um lar.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de São José do Rio Preto – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pelo oferecimento de estudo de alta qualidade, ótima estrutura física, excelente corpo docente e servidores que me inspiram diariamente em minha graduação e formação.

A minha orientadora Profa. Dra. Paula Rahal, pelo exemplo de profissionalismo, dedicação e esforço. Pela oportunidade de realizar este projeto de pesquisa que me proporcionou tamanho crescimento pessoal e profissional.

As minhas coorientadoras Profa. Dra. Cintia Bittar Oliva e Profa. Dra. Marília de Freitas Calmon Saiki.

A todos pacientes inseridos nesse estudo. Anônimos do cotidiano que acreditam no poder da ciência.

A todos os funcionários da UPA – Mirassol. Aos auxiliares de limpeza, médicos, enfermeiros e técnicos de enfermagem. No qual destaco o auxílio oferecido pela exímia profissional Ismênia. Com os quais compartilhei inúmeras segundas e terças na luta constante pela coleta de amostras.

A Bianca e Pamêla, pelo auxílio no processamento e realização de extrações e PCR em Tempo Real.

Ao Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira e Dra. Ana Carolina Bernardes Terzian pela realização dos PCR em Tempo Real Multiplex (*Fourplex*) para detecção de possíveis coinfeções por DENV.

A minha família, sem a qual jamais teria alcançado todos os louros conquistados. Aos meus pais, Carla e Antonio, nos quais me espelho diariamente e tomo como exemplo a ser seguido. A minha irmã, Luana, pela parceria e amor compartilhado nos anos decorridos. Luna, Leco, Lucius, Lili, Lara e Lola, alegrias e irmãos de alma. Meus agradecimentos.

Aos companheiros de Laboratório: Ágata, Ana, Ana Emília, Bárbaras Florianos, Carina, Daiane, Dayla, Francielly, Gregory, Guilherme, Gustavo, Igor, Lenira, Maria Letícia, Mariana, Nayara, Tairine, Tamara, Paola, Patrícia, Rafael, Ricardo. Diariamente trocando experiências que somaram ao meu aprendizado.

Aos meus amigos com os quais compartilhei experiências, alegrias, angústias e felicidades. Nos quais destaco aqueles que estiveram presentes comigo até o fim, Rafaela, Andreia, Luiz Fernando, Beatriz, Tatiane, Maxwell, Guilherme, Bruno, Juliana, Natália, Leticia, Maryanna, Geisla, Talita, Fernando, Olavo, Ana Gauy e Marcela. Fundamentais para as discussões acaloradas e os lazares do dia a dia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro e apoio concedido (CNPq – Proc 131910/2017-5).

EPIGRAFE

“Não é no silêncio que os homens se fazem, mas na palavra, no trabalho, na ação-reflexão.”

Paulo Freire (1987, p. 78)

RESUMO

O Zika vírus (ZIKV), pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, é um dos arbovírus transmitidos por mosquitos hematófagos do gênero *Aedes*. Durante a epidemia de Zika no Brasil foi observado um aumento de quase 20 vezes nos casos reportados de microcefalia em fetos, levando a OMS a declarar estado de emergência global. A expansão do Zika vírus (ZIKV) pelas Américas ressalta a importância da vigilância e monitoramento de doenças emergentes. Uma vez reportado que cerca de 80% das pessoas infectadas pelo vírus não apresentam sintomas, o presente estudo coletou amostras de soro e urina de pacientes sintomáticos e de urina de pacientes sem sintomas clínicos para arboviroses na Unidade de Pronto Atendimento do município de Mirassol/SP. As amostras de sangue e urina foram processadas no Laboratório de Estudos Genômicos (IBILCE/UNESP). Após a extração do RNA viral, elas foram testadas para presença de ZIKV por meio da técnica de RT-qPCR. As amostras positivas para ZIKV em soro foram avaliadas para coinfeção por DENV. Por meio de questionários, foram avaliados os sintomas apresentados pelos pacientes e construídos mapas georreferenciados para avaliar a distribuição do vírus. Dos 141 pacientes sintomáticos e dos 447 sem sintomas clínicos, 9,9% e 6,6% foram positivos para ZIKV, respectivamente. No total, a presença de ZIKV foi vista em 7,5% dos pacientes coletados, compreendidas em 32% no grupo de pacientes sintomáticos e 68% no grupo de sem sintomas clínicos. Dos pacientes avaliados para possível coinfeção, 8,7% apresentaram coinfeção por ZIKV/DENV-2. Os sintomas mais relatados pelos pacientes sintomáticos positivos para ZIKV foram dores musculares, dor nos olhos e febre. Os mapas georreferenciados revelaram que duas regiões compreenderam 46% dos casos positivos no município de Mirassol. O uso concomitante de amostras de soro e urina para diagnósticos de arboviroses são importantes para revelar casos positivos subnotificados em pacientes. Destaca-se a importância de um diagnóstico específico e laboratorial mais efetivo por meio da utilização de amostras de soro e urina de pacientes para revelar casos positivos sub-notificados em pacientes. Ademais, nossos dados são importantes para articulação e desenvolvimento de campanhas de vigilância, controle de vetores e de possíveis doenças associadas com o objetivo de prever novas emergências epidemiológicas no mesmo município e em municípios vizinhos.

Palavras-chave: Zika vírus, ZIKV, sintomáticos, sem sintomas clínicos, sangue, soro, urina, diagnóstico, coinfeção.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV), family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*, is one of the arboviruses transmitted by hematophagous mosquitoes of the genus *Aedes*. During the Zika epidemic in Brazil an almost 20-fold increase was observed in reported cases of microcephaly in fetuses, leading to WHO declaring a state of global emergency. The expansion of the Zika virus (ZIKV) across the Americas underscores the importance of surveillance and monitoring of emerging diseases. Recent studies reported that about 80% of people infected with the virus do not present symptoms, thus the present study collected serum and urine samples from symptomatic and urine patients from patients with no clinical symptoms for arboviruses at the Emergency Care Unit in the municipality of Mirassol/SP. Blood and urine samples were processed in the Laboratory of Genomic Studies (IBILCE/UNESP). After extraction of viral RNA, they were tested for the presence of ZIKV by RT-qPCR reaction. ZIKV positive serum samples were also evaluated for DENV coinfection. Through questionnaires, the symptoms presented by the patients were evaluated and georeferenced maps were constructed to evaluate the distribution of the virus. Of the 141 symptomatic patients and 447 without clinical symptoms, 9.9% and 6.6% were positive for ZIKV, respectively. In total, the presence of ZIKV was seen in 7.5% of the patients collected, comprised in 32% of symptomatic patients and 68% of those without clinical symptoms. Of the patients evaluated for possible coinfection, 8,7% were coinfecting with ZIKV/DENV-2. The most reported symptoms by symptomatic patients positive for ZIKV were muscle pain, eye pain and fever. The georeferenced maps revealed that two regions comprised 46% of the positive cases in the municipality of Mirassol. The concomitant use of serum and urine samples for arbovirus diagnoses are important to reveal underreported positive cases in patients. The importance of a more specific and laboratory diagnosis through the use of serum and urine samples from patients to reveal sub-notified positive cases in patients is emphasized. In addition, our data are important for articulation and development of surveillance campaigns, vector control and possible diseases associated with the objective of predicting new epidemiological emergencies in the same municipality and in neighboring municipalities.

Key words: Zika virus, ZIKV, symptomatic, without clinical symptoms, blood, serum, urine, diagnosis, coinfection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Mapa mostrando a distribuição mundial reportada de arboviroses. JEV: *Japanese encephalitis virus*; DENV: *Dengue virus*; YFV: *Yellow fever virus*; ZIKV: *Zika virus*; CHIKV: *Chikungunya virus*; RVFV: *Rift Valley fever virus*; MAYV: *Mayaro virus*; OROV: *Oropouche virus*.....**16**
- Figura 2. Estrutura do vírus Zika e seu genoma.** O vírus Zika apresenta 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) e três estruturais (C, prM, E).....**21**
- Figura 3.** Número de amostras coletadas e amostras positivas por mês dos pacientes sintomáticos.....**36**
- Figura 4.** Número de amostras coletadas e amostras positivas por mês dos pacientes sem sintomas clínicos para arboviroses.....**40**
- Figura 5.** Número de pacientes positivos e respectiva porcentagem para ZIKV de acordo com o mês e com o quadro clínico apresentado no momento da coleta.....**43**
- Figura 6.** Número de amostras coletadas e amostras positivas por mês de todos os pacientes inseridos no estudo.....**43**
- Figura 7.** Porcentagem de sintomas declarados no momento da coleta por pacientes sintomáticos e sem sintomas clínicos para arboviroses positivos para ZIKV.....**44**
- Figura 8.** Distribuição dos pacientes positivos no interior do Brasil.....**46**
- Figura 9.** Distribuição dos pacientes positivos no interior do estado de São Paulo.....**47**
- Figura 10.** Distribuição dos pacientes positivos no município de Mirassol/SP. Regiões 1 e 2 correspondidas por um raio de 765m para bairros residenciais do município.....**48**
- Figura 11.** Índices de precipitação, temperaturas máximas, médias e mínimas do ano de 2018 do município de Mirassol/SP.....**49**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação do Índice de Breteau nos anos de 2016, 2017 e 2018 no município de Mirassol.....	28
Tabela 2. Sonda e Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de OneStep-qPCR para detecção de ZIKV.....	32
Tabela 3. Etapas da ciclagem da mistura do preparado para PCR em Tempo Real para ZIKV.....	33
Tabela 4. Dados epidemiológicos dos 141 pacientes sintomáticos para arboviroses.....	35
Tabela 5. Quantidade de pacientes positivos para ZIKV de acordo com os fluidos.....	35
Tabela 6. Quantidade de dias de sintomas apresentados pelos pacientes positivos para ZIKV. Amarelo: pacientes positivos apenas em urina; Laranja: pacientes positivos apenas em soro; Azul: pacientes positivos em soro e urina; d: dias; - : não apresentou sintomas e x : apresentou sintomas, mas não se recorda há quantos dias.....	37
Tabela 7. Dados de coinfeção de ZIKV e DENV-2. Cor azul: ZIKV (urina) – DENV-2 (soro e urina); laranja: ZIKV (soro) – DENV-2 (soro); roxo: ZIKV (soro) – DENV-2 (soro e urina) e amarelo: ZIKV (urina) – DENV-2 (soro).....	38
Tabela 8. Dados epidemiológicos dos 447 pacientes sintomáticos para arboviroses.....	39
Tabela 9. Quantidade de dias de sintomas apresentados pelos pacientes sem sintomas clínicos para arboviroses positivos para ZIKV. d: dias; - : não apresentou sintomas e x : apresentou sintomas, mas não se recorda há quantos dias.....	41
Tabela 10. Dados epidemiológicos dos 30 pacientes positivos para ZIKV.....	42
Tabela 11. Sinmatologia dos pacientes positivos para arboviroses inseridos no estudo.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE - Aprimoramento dependente de anticorpos

ADL – Avaliação de Densidade Larvária

C – Proteína de capsídeo

CHIKV – *Chikungunya virus*

CZS – Síndromes Congênitas do Zika

DENV – *Dengue virus*

DENV-1 – Dengue sorotipo 1

DENV-2 – Dengue sorotipo 2

DENV-3 – Dengue sorotipo 3

DENV-4 – Dengue sorotipo 4

E – Proteína de envelope

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ensaio de imunoabsorção enzimática)

G/RCF – G/Relative Centrifugal Force

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBILCE – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

JEV – *Japanese encephalitis virus*

LIRAA – Levantamento Rápido do Índice de Infestação por *Aedes aegypti*

MAYV – *Mayaro virus*

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF – Matriz de leitura aberta

OROV – *Oropouche virus*

prM – Pré membrana/membrana

PRNT – Teste de neutralização de redução de placa

qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real ou quantitativo

RT-PCR – Reverse transcription polymerase chain reaction (transcriptase reversa reação em cadeia da polimerase)

RVFV – *Rift Valley fever virus*

SE – Semana epidemiológica

SGB – Síndrome de Guillain-Barré

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNESP – Universidade Estadual Paulista

UPA – Unidade de Pronto Atendimento

UTR – Regiões não traduzíveis

WNV – *West Nile virus*

YFV – *Yellow fever virus*

ZIKV – *Zika virus*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Arbovírus	16
1.2. Epidemiologia: histórico e epidemias do <i>Zika virus</i>	17
1.3. ZIKV no Brasil	18
1.4. Sinais Clínicos	20
1.5. O vírus	21
1.6 Interação vírus-célula hospedeira	22
1.7 Patogênese	23
1.8. Transmissão do ZIKV	24
1.8.1. Vetorial	24
1.8.2. Independente de vetor	24
1.9. Diagnóstico e monitoramento	26
1.10 Epidemiologia de arboviroses no município de Mirassol	27
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Comitê de Ética em Pesquisa	31
3.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	31
3.3 Casuística e processamento das amostras	32
3.4 Processamentos das amostras	32
3.5 Extrações de RNA	33
3.6 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)	34
3.7 Acompanhamentos de pacientes positivos	35
3.8 Confeções de mapas georreferenciados para avaliação da distribuição de ZIKV no município	35
3.9 Análises Estatísticas	36
4. RESULTADOS	37
4.1 Pacientes sintomáticos	37
4.2 Pacientes sem sintomas clínicos para arboviroses	41
4.3 Análises dos pacientes positivos para ZIKV	44
4.4 Acompanhamentos de pacientes positivos	47
4.5 Distribuição temporal e espacial de ZIKV	48
4.6 Medições climáticas e pluviométricas	51

5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXOS	75

1. INTRODUÇÃO

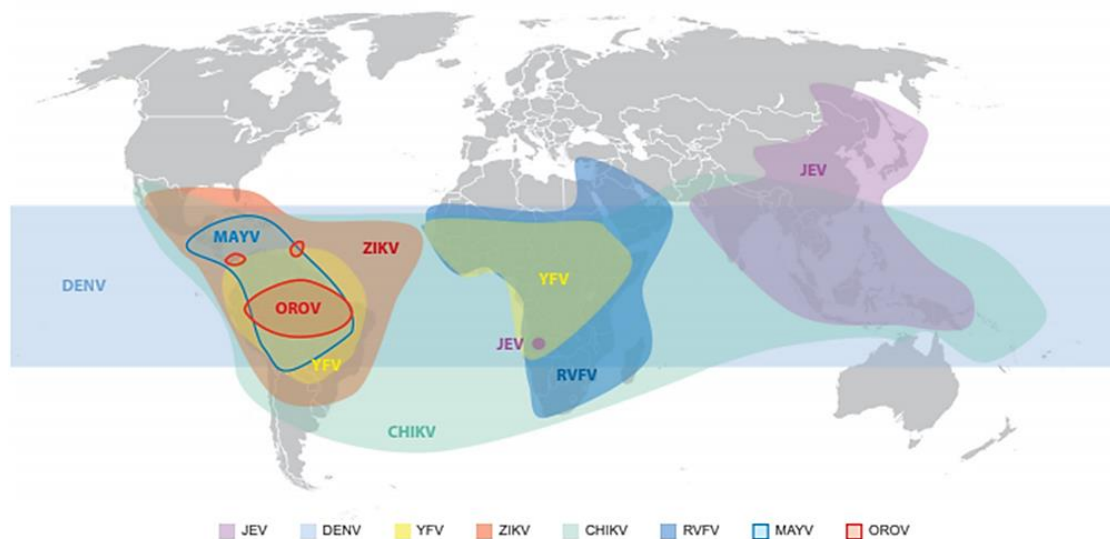
1.1. Arbovírus

Os arbovírus (*Arthropod-borne virus*) são vírus transmitidos por artrópodes hematófagos a hospedeiros vertebrados (Weaver e Reisen, 2010). A rápida urbanização tropical associada a precarização das condições sanitárias está diretamente relacionada a emergência dos arbovírus, uma vez que a criação de ilhas de calor urbana favorece a expansão dos insetos vetores e a transmissão viral (Weaver e Reisen, 2010; Hubalek *et al.*, 2014). São considerados os principais responsáveis por problemas de saúde pública, econômica e social em todo o mundo, causando epidemias e surtos esporádicos de doenças, afetando populações humanas e, também, outros animais (Cleton *et al.*, 2012; Bolling *et al.*, 2015).

Alguns dos principais arbovírus, causadores dos surtos, são os transmitidos por mosquitos, como os Zika vírus (ZIKV), Dengue vírus (DENV), Chikungunya vírus (CHIKV), *Yellow fever virus* (YFV), *Japanese encephalitis virus* (JEV), *West Nile virus* (WNV), e *Rift Valley fever virus* (RVFV) (Bolling *et al.*, 2015). Eles estão distribuídos em escala mundial concentrados nas limitações dos trópicos devido as condições climáticas favoráveis a manutenção do ciclo viral (Figura 1). Das 545 espécies de arbovírus, mais de 150 foram documentadas causando doenças em humanos, sendo a maioria distribuída em cinco famílias: *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* e *Orthomyxoviridae* (Cleton *et al.*, 2012).

O Brasil apresenta grande número de arbovírus já identificados (Donalisio *et al.*, 2017). Sua extensão territorial, a presença de florestas tropicais e outros ecossistemas naturais proporcionam um ambiente favorável para o desenvolvimento de vetores como mosquitos dos gêneros *Culex* e *Aedes* e conseqüentemente circulação dos arbovírus (Figueiredo, 2007) (Figura 1).

Figura 1. Mapa mostrando a distribuição mundial reportada de arboviroses. JEV: *Japanese encephalitis virus*; DENV: *Dengue virus*; YFV: *Yellow fever virus*; ZIKV: *Zika virus*; CHIKV: *Chikungunya virus*; RVFV: *Rift Valley fever virus*; MAYV: *Mayaro virus*; OROV: *Oropouche virus*.



Fonte: (Weaver *et al.*, 2018).

As principais manifestações clínicas das arboviroses podem ser classificadas em doenças febris (com apresentação de sintomas como febre e dores de cabeça), erupções cutâneas e artralgia, síndromes neurológicas (as quais podem desencadear mielite, meningite e encefalite, assim como alterações comportamentais), síndromes hemorrágicas associadas a sangramentos espontâneos ou persistentes e choque combinado com uma contagem de plaquetas severamente baixa (Cleton *et al.*, 2012; De Andrade *et al.*, 2017; Mayer *et al.*, 2017). A similaridade dos sintomas derivados das infecções por arbovírus, bem como reatividade cruzada entre sorogrupos da mesma família, em testes sorológicos podem desencadear dificuldade na identificação viral assim como na definição do diagnóstico clínico (Ozkurt e Tanriverdi, 2017).

1.2. Epidemiologia: histórico e epidemias do *Zika virus*

O *Zika virus* (ZIKV), causador da febre Zika, foi identificado inicialmente em 1947 ao ser isolado de um macaco-rhesus (*Macaca mulata*) sentinela na floresta Zika em Uganda (Dick *et al.*, 1952). Posteriormente, o segundo isolamento do Zika foi feito a partir de espécimes de *Aedes africanus* capturados, na mesma floresta, em 1948 (Weinbren e Williams, 1958; Haddow *et al.*, 1964). Em 1954, três casos humanos foram relatados como positivos para a infecção por ZIKV durante uma investigação de um surto de icterícia suspeita de Febre Amarela no Leste da Nigéria (Macnamara, 1954). O

vírus foi isolado a partir de uma amostra de soro de uma menina de 10 anos com histórico sintomático de dores de cabeça, enquanto que em outros dois pacientes foi detectado aumento de anticorpos contra o ZIKV (Macnamara, 1954). No entanto, uma investigação posterior mostrou que o patógeno infeccioso era, na verdade, o vírus *Spondweni*, intimamente relacionado ao ZIKV (Wikan e Smith, 2016).

O primeiro caso de infecção natural por ZIKV foi relatado por Simpson (1964), o qual descreveu o curso da doença em si mesmo, adquirida durante uma pesquisa com o propósito de isolar novas cepas do vírus a partir de *Aedes africanus* na floresta Zika (Simpson, 1964). Em seus relatos, Simpson (1964) declara ter apresentado erupção maculopapular no rosto, pescoço, tronco e braços, bem como um mal-estar ligeiro e resposta febril ao vírus.

Desde sua identificação, o ZIKV apresentou baixa circulação, uma vez que pesquisas sorológicas apontaram, por meio da detecção de anticorpos específicos em várias espécies de mamíferos e roedores, que a circulação do ZIKV era caracterizada como silenciosa, apresentando uma distribuição geográfica restrita aos países da África e Sudeste Asiático (Singh *et al.*, 2016). Esse quadro mudou em 2007, quando 73% da população de Yap (Estados Federados da Micronésia) foi infectada pelo vírus. Desde então, o ZIKV apresenta uma rápida dispersão mundial (Duffy *et al.*, 2009; Perkasa *et al.*, 2016). Embora não tenha sido registrado casos severos de sintomas relacionados com complicações decorrentes da infecção pelo vírus durante o surto em 2007, uma epidemia dessa magnitude chamou atenção dos pesquisadores ao redor do mundo uma vez que até a época poucos casos de febre Zika haviam sido registrados (Duffy *et al.*, 2009). Em 2013, a Polinésia Francesa e demais ilhas vizinhas, durante uma nova epidemia de ZIKV, registraram um aumento na frequência de casos reportados de Síndrome de Guillain-Barré (SGB), uma doença caracterizada pelo ataque ao sistema nervoso periférico pelo próprio sistema imunológico do paciente, podendo levar a paralisção dos membros superiores e inferiores, com complicações que podem levar a dificuldades respiratórias (Musso *et al.*, 2015; Nascimento e Da Silva, 2017).

1.3. ZIKV no Brasil

Estudos filogenéticos sugerem que o ZIKV tenha sido introduzido no Brasil durante a realização de um campeonato mundial de canoagem (*International Va'a Federation World Sprint Championship*), em Agosto de 2014, que contou com a participação da Polinésia Francesa e mais outros 3 países endêmicos da região Pacífica (Musso *et al.*,

2015). Isso foi proposto porque a variante viral mais próxima a circulante do Brasil foi isolada de um paciente franco-polinésio durante a epidemia de 2014 (Campos *et al.*, 2015; Calvet *et al.*, 2016). No entanto, novos estudos sugerem que a entrada tenha ocorrido anteriormente, em Fevereiro de 2014 (Faria *et al.*, 2017). Faria *et al.* (2017) destacaram o impacto da epidemia de Zika vírus no Brasil por meio de análises filogenéticas de genomas completos do patógeno, apontando o país como a origem dos novos surtos de Zika que ocorreram, posteriormente, em diferentes localidades das Américas do Sul e Central chegando ao México em novembro de 2015 (Zanluca *et al.*, 2015; Metsky *et al.*, 2017). Ademais, Faria *et al.* (2017) apontou a região Nordeste como ponto inicial da introdução do vírus no país, levando posteriormente a uma rápida disseminação em toda a América do Sul e Central.

Posteriormente, Massad *et al.* (2017) apontaram a partir do uso de modelos matemáticos que a introdução do ZIKV no Brasil provavelmente tenha ocorrido por meio do retorno de viajantes infectados ao país entre os meses de Outubro de 2013 – Março de 2014 (Massad *et al.*, 2017) Porém, Passos *et al.* (2017) por meio da análise de soro de pacientes coletados durante uma epidemia de DENV na cidade do Rio de Janeiro apresentaram dados que sugerem que a circulação do ZIKV já ocorre desde Abril de 2013 no município (Passos *et al.*, 2017). Esses dados são consistentes com o relatório de (Metsky *et al.*, 2017) que atentou ao fato de que o vírus tenha circulado em diversas regiões por muitos meses de forma indetectadas antes dos relatos iniciais dos casos.

O primeiro caso autóctone do ZIKV no Brasil foi confirmado em Maio de 2015 (Zanluca *et al.*, 2015). Durante a epidemia de Zika vírus no Brasil foi observado um aumento de quase 20 vezes nos casos reportados de microcefalia em fetos (Fauci e Morens, 2016). Em Outubro de 2015, foi proposta por neurologistas do Estado do Pernambuco uma possível relação entre o desencadeamento de síndromes congênitas e a infecção pelo vírus (Kleber De Oliveira *et al.*, 2016). Além disso, também foi observado um aumento de casos de Síndrome de Guillain-Barré (GBS) no Brasil, Colômbia, *El Salvador*, Martinica e Suriname (Campos *et al.*, 2015), levando o Ministério da Saúde a declarar estado de emergência em saúde pública nacional em Novembro de 2015 (Fauci e Morens, 2016). Posteriormente, em Fevereiro de 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu quadro de emergência em saúde pública global devido ao aumento de casos confirmados de microcefalia e doenças neurológicas como consequência da infecção pelo ZIKV (Baud *et al.*, 2017). No ano de 2016 foram

registrados cerca de 211.487 casos prováveis do ZIKV em 102,6/100 mil habitantes no Brasil (BRASIL, 2017). Em Novembro do mesmo ano, a OMS declarou a febre Zika não mais um quadro de emergência em saúde pública global em decorrência da diminuição dos casos reportados de microcefalia associados a infecção por ZIKV (Baud *et al.*, 2017).

Em relação aos índices de alterações no crescimento e desenvolvimento no feto relacionadas a infecção pelo ZIKV, da 32ª semana epidemiológica de 2015 até a 40ª semana epidemiológica (SE) de 2018, 16.735 casos suspeitos foram notificados, nos quais 3.267 casos foram confirmados e associados a infecção por Zika vírus (BRASIL, 2018). Foram notificados 4.121 casos em 2015, 8.609 em 2016, 2.651 em 2017 e 1.354 em 2018 (BRASIL, 2018). Dos casos notificados no ano de 2015, 23,4% (966 casos) dos casos foram confirmados com relação à infecção por ZIKV até a SE 40/2018 (BRASIL, 2018). Esse percentual foi de 22,2%, 11,8% e 5,8% para os anos de 2016, 2017 e 2018, respectivamente (BRASIL, 2018).

Até o momento, 27 estados da federação já confirmaram sua circulação de ZIKV. Em todo o país o número de casos prováveis, com incidência de febre pelo ZIKV foi de 15.586, destes 3.308 (43,8%) casos foram confirmados até a 42ª semana epidemiológica de 2018 (BRASIL, 2018). No ano de 2018, a região sudeste apresenta-se como a de maior prevalência, com 2.779 casos prováveis (36,8% dos casos registrados), seguido pelas regiões nordeste (2.184 casos; 29%), Centro-Oeste (1.596 casos; 21,2%), Norte (944 casos; 12,5%) e Sul (41 casos; 0,5%) (BRASIL, 2018).

1.4. Sinais Clínicos

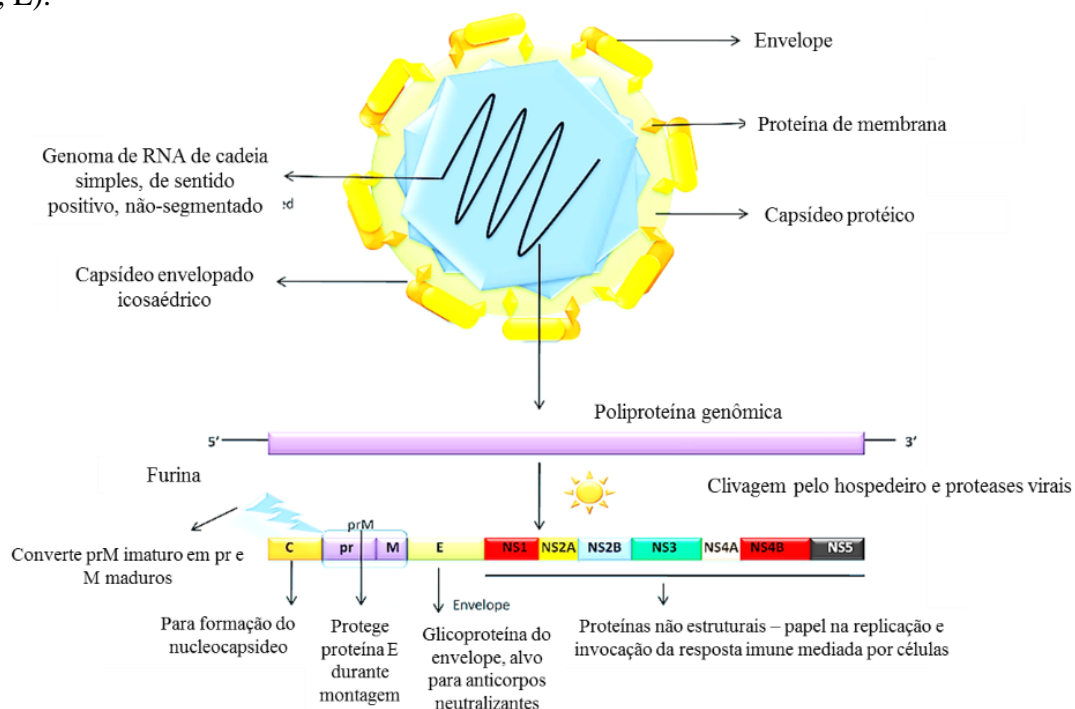
Os sinais clínicos em casos sintomáticos tendem a aparecer após o período de incubação de 3 a 12 dias (Gabaglia, 2017; Sharma e Lal, 2017). Os sinais clínicos incluem febre aguda, erupções cutâneas maculopapulares, conjuntivite não purulenta, artralgia, dor de cabeça, mialgia, astenia, edema de mão e pés e sinais menos evidentes como anorexia, dor abdominal, vômitos, diarreia, vertigem, sensação de queimação da sola do pé e da palma da mão (Singh *et al.*, 2016). Além dos sintomas característicos de uma arbovirose, a infecção também pode desencadear sintomas urogenitários, como hematospermia e hipotensão em casos raros (Musso *et al.*, 2015). Os sintomas são geralmente autolimitados e podem durar de 4 a 7 dias (Barrera-Cruz *et al.*, 2016). Estes sinais clínicos sobrepõem com os sintomas da Dengue e Chikungunya, embora os induzidos pelo vírus Zika sejam mais brandos. O início abrupto da febre e a aparência

de erupções cutâneas, que desaparecem rapidamente com o tempo, são as principais características para a febre Zika (Carneiro e Travassos, 2016).

1.5. O vírus

O ZIKV, pertencente a família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, é um dos arbovírus transmitidos por mosquitos hematófagos majoritariamente do gênero *Aedes* (Kuno e Chang, 2007; Chang *et al.*, 2016) e apresenta-se como um vírion envelopado, icosaédrico de 40 a 50 nm de diâmetro (White *et al.*, 2016). Do ponto de vista genético, o ZIKV possui um genoma de RNA, fita simples, de polaridade positiva, com aproximadamente 11 kb e uma única matriz de leitura aberta (ORF) flanqueadas por regiões não traduzíveis (UTR) nas porções 5' e 3' (Zhu *et al.*, 2016; Sevvana *et al.*, 2018). As regiões 5'UTR e 3'UTR apresentam elementos regulatórios importantes para a síntese do RNA viral (Kuno e Chang, 2007). A organização do genoma do ZIKV segue o padrão de outros *Flavivirus*: 5'UTR – C – prM – E – NS1 – NS2a – NS2b – NS3 – NS4a – NS4a – NS5 – 3'UTR (Kuno e Chang, 2007) (Figura 2). O RNA genômico é traduzido em uma única poliproteína de 3423 aminoácidos que quando clivada da origem a três proteínas estruturais: envelope (E), pré membrana/membrana (prM) e capsídeo (C) e sete proteínas não estruturais (NS) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Cunha *et al.*, 2016; White *et al.*, 2016). As proteínas estruturais compõem a partícula viral, empacotando o genoma do vírus em um invólucro e apresentam importante papel na interação do vírus com a célula hospedeira. As proteínas não estruturais são requeridas em sua morfogênese assim como em etapas de replicação (Blitvich e Firth, 2015) (Figura 2).

Figura 2. Estrutura do vírus Zika e seu genoma. O vírus Zika apresenta 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) e três estruturais (C, prM, E).



Fonte: (Singh *et al.*, 2016)

1.6 Interação vírus-célula hospedeira

Assim como outros arbovírus, a replicação do ZIKV ocorre em células dendríticas e em seguida se dispersa pelos linfonodos e corrente sanguínea (Diamond *et al.*, 2003). ZIKV isolados da Polinésia Francesa exibiram alta afinidade com células dendríticas imaturas humanas, fibroblastos dérmicos e queratinócitos epidérmicos (Hamel *et al.*, 2015). Nos vetores do gênero *Aedes*, o vírus pode se replicar no intestino médio, enquanto se alimentam de sangue, e em seguida nas glândulas salivares (Chan *et al.*, 2016). A transmissão vertical do ZIKV por via transovariana também já foi reportada (Da Costa *et al.*, 2018).

A transmissão do ZIKV do mosquito *Aedes* para o ser humano ocorre durante o repasto sanguíneo. Nesse momento, o vírus entra nas células por meio de receptores AXL, DC-SIGN, TYRO3 e TIM-1, que são encontrados na superfície da pele e das células nervosas (Hamel *et al.*, 2015). Dentro das células, o vírus utiliza a maquinaria do hospedeiro para replicar-se, e apesar da replicação ocorrer no citoplasma, antígenos do ZIKV já foram observados no núcleo de células hospedeiras (Buckley e Gould, 1988). Finalmente, o vírus causa apoptose e autofagia das células, facilitando a sua entrada em outras células (Hamel *et al.*, 2015). O ZIKV estimula a transcrição de TLR-

3, MDA5, RIG-I e também de genes de interferon como OAS2, ISG15 e MX1 que são responsáveis pelo desenvolvimento do quadro sintomático em pacientes infectados (Hamel *et al.*, 2015). É por meio da indução da autofagia das células do hospedeiro que sua replicação é aumentada, assim, agentes que inibem a autofagia podem diminuir sua carga viral (Carneiro e Travassos, 2016). Após a replicação local, o vírus pode ser distribuído a diferentes regiões do organismo como músculos, coração, sistema nervoso central e também ao feto, através da barreira placentária por meios dos vasos sanguíneos e linfáticos (Chan *et al.*, 2016). Estudos que apresentam o ZIKV isolado a partir de tecido cerebral fetal, placenta (Mlakar *et al.*, 2016), tecido ocular, vagina, testículo e diversos fluídos corporais demonstram um amplo tropismo celular e tecidual do vírus (Miner e Diamond, 2017).

1.7 Patogênese

A infecção por ZIKV durante a gravidez pode levar ao desenvolvimento de Síndromes Congênitas do Zika (*Congenital Zika Syndrome – CZS*) (Moore *et al.*, 2017). As características clínicas da CZS estão associadas a danos neurológicos diretos e perda grave de volume intracraniano (Moore *et al.*, 2017). Sua definição pode estar associada por cinco características: microcefalia grave com parcial colapso do crânio; redução do tecido cerebral; danos na parte de trás do olho, como cicatrizes maculares e manchas na retina; contraturas congênitas, como artrogripose (limitação de movimentos) e pés tortos; limitações do movimento do corpo (Moore *et al.*, 2017). Além disso, as CZS também podem estar relacionadas com outras anormalidades, como atrofia e assimetria cerebral, estruturas cerebrais anormalmente formadas ou ausentes, distúrbios da hidrocefalia e migração neuronal (Moore *et al.*, 2017).

O desenvolvimento da microcefalia e SGB associados às recentes epidemias ocorridas no sul do Pacífico e nas Américas levaram os pesquisadores a desenvolverem hipóteses para explicar essa emergência de síndromes associadas ao ZIKV sem precedentes. Dentre elas, podemos destacar as consequências derivadas das diferenças genéticas adquiridas pela cepa asiática ao longo da história evolutiva do vírus. Em comparação com a cepa africana, a cepa asiática que está intimamente relacionada as recentes epidemias, apresenta-se mais adaptada aos seres humanos, levando a infecções com maiores índices de viremia, aparecimento de transmissão transplacentária e modificações no tropismo celular do vírus (Weaver *et al.*, 2016). Além disso, um dos motivos dos surtos recentes do ZIKV terem causado maior alarde do que os anteriores,

pode estar relacionado a sua ocorrência em regiões hiperendêmicas do vírus da dengue (Dejnirattisai *et al.*, 2016).

A ocorrência de formas hemorrágicas da dengue tem sido associada à presença de anticorpos derivada de infecções sequenciais por sorotipos diferentes do mesmo vírus (Halstead, 1981). Diante disso, explica-se que a presença de anticorpos contra um sorotipo específico poderia sensibilizar a resposta imunológica do indivíduo a uma segunda infecção (Halstead, 1981). O aprimoramento dependente de anticorpos (*Antibody-dependent enhancement*, ADE) da infecção é comum entre os sorotipos do DENV (Halstead, 1981; Bardina *et al.*, 2017). Assim, foi levantada a hipótese de que o ADE, derivados de uma exposição anterior ao DENV, pode ter causado o aumento da infecção por Zika (Lazear e Diamond, 2016; Bardina *et al.*, 2017). Dessa forma, as adaptabilidades adquiridas ao longo do tempo evolutivo pelo vírus, tanto ao vetor quanto ao hospedeiro, juntamente com a distribuição de mosquitos do gênero *Aedes* em regiões endêmicas para outros *Flavivirus* pode ser uma das razões levantadas para explicar o repentino surgimento desses surtos nas Américas (Fajardo *et al.*, 2016).

1.8. Transmissão do ZIKV

1.8.1. Vetorial

A principal forma de transmissão do ZIKV ocorre por insetos vetores principalmente mosquitos do gênero *Aedes*, que também disseminam o DENV, CHIKV e YFV. Aproximadamente, 2,6 bilhões de pessoas estão localizadas em áreas tropicais e subtropicais que apresentam vetores como *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes africanus* entre outros (Bogoch *et al.*, 2016). Estudos sugerem que mosquitos pertencentes a outros gêneros, como o *Culex*, que transmite o *West Nile virus* (WNV) e *Japanese encephalitis virus* (JEV), podem estar envolvidos na transmissão do ZIKV, visto que foi relatada a capacidade replicativa do ZIKV no mosquito *Culex quinquefasciatus* no Brasil (Guedes *et al.*, 2017). Importante ressaltar que a transmissão vertical do ZIKV já foi encontrada em mosquitos *Aedes aegypti* (Thangamani *et al.*, 2016).

1.8.2. Independente de vetor

Relatos de transmissão perinatal foram registrados pela primeira vez durante o surto epidêmico de ZIKV na Polinésia Francesa (Besnard *et al.*, 2014). Durante a epidemia registrada no Brasil, grupos de pesquisas demonstraram a presença do vírus em tecido

cerebral e em líquido amniótico de fetos abortados (BRASIL, 2017). Este fato reforça a relação do ZIKV com casos de microcefalia, registrando os primeiros eventos de transmissão via intrauterina, concomitantemente confirmando a possibilidade de transmissão vertical humana do arbovírus (Calvet *et al.*, 2016; Mlakar *et al.*, 2016; Rasmussen *et al.*, 2016). No entanto, a transmissão vertical não ocorre em todas as mulheres grávidas infectadas com o ZIKV, assim como nem todos os fetos expostos apresentam infecção congênita sintomática, comportamento semelhante a infecção por citomegalovírus e toxoplasmose (Baud *et al.*, 2017). Partículas virais infecciosas foram detectadas no leite materno de três mães, mas a transmissão neonatal pela amamentação até agora não foi descrita (Colt *et al.*, 2017).

Recentemente, os pesquisadores elevaram os esforços a fim de estudar a transmissão sexual do vírus (Atkinson *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). Esses estudos revelaram pacientes infectados com o ZIKV em regiões onde não há registros da circulação do vetor, constatando a capacidade do vírus disseminar-se por meio da relação sexual (Musso *et al.*, 2015; Freour *et al.*, 2016). Moreira e colaboradores (2017) avaliaram que a possibilidade de transmissão sexual foi documentada em 18 estudos dentre 27 episódios prováveis ou confirmados de transmissão, as quais foram adquirida por relação sexual em mais de 10 países sem a presença do vetor (Moreira *et al.*, 2017). Em sua maioria, os casos relataram o aparecimento de sintomas e a confirmação da infecção por ZIKV em pacientes que realizaram relação sexual com indivíduos com histórico de viagens para países tropicais, sendo diagnosticada em apenas um estudo a presença do vírus em paciente assintomático (Foy *et al.*, 2011; Frank *et al.*, 2016; Mccarthy, 2016). Os tipos de relações sexuais avaliados por Moreira (2017) foram vaginais, orais e anais, e embora a maioria dos relatos tenha sido comprovada por meio da detecção de ZIKV em amostras de sêmen (Nicastri *et al.*, 2016) e urina (Gourinat *et al.*, 2015; Abd El Wahed *et al.*, 2017) de pacientes masculinos, também foi documentado a detecção do vírus em urina (Terzian *et al.*, 2017) e fluídos vaginais (Murray *et al.*, 2017) de pacientes femininos, sugerindo que a mulher pode desempenhar papel importante na transmissão sexual. A documentação de casos de transmissão sexual onde o paciente *index* não apresentou sintomas da febre Zika é preocupante uma vez que casos assintomáticos relacionados com a infecção por ZIKV é mensurado em até 80%, favorecendo assim a transmissão sexual. Além disso, a detecção de vírus em mulheres eleva a problemática da transmissão vertical em

pacientes em período gestacional (Moreira *et al.*, 2017; Terzian *et al.*, 2017; Colombo *et al.*, 2018).

Também foi demonstrada a possibilidade da transmissão por transfusão sanguínea e hemoderivados uma vez que sua disseminação ocorre via corrente sanguínea (Musso *et al.*, 2015; Hassan *et al.*, 2017). O potencial de transmissão via transfusão foi relatada na Polinésia Francesa quando cerca de 8% de doadores assintomáticos apresentaram detecção de RNA do Zika vírus (Musso *et al.*, 2014; Magnus *et al.*, 2018). Assim como a transmissão sexual, a transmissão via transfusão de sangue é difícil de ser confirmada em áreas endêmicas. Tais relatos demonstram a capacidade do vírus em ser transmitido na ausência de vetores (Baud *et al.*, 2017).

1.9. Diagnóstico e monitoramento

A infecção por ZIKV pode ser diagnosticada com base em sintomas clínicos, prevalência de vetor na região e por testes de detecção sorológica e molecular (Adebanjo *et al.*, 2017). O diagnóstico sorológico envolve a detecção de anticorpos IgG e IgM no soro de pacientes por ensaio de imunoabsorção enzimática (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) (Staples *et al.*, 2016; Adebanjo *et al.*, 2017). No entanto, a reação cruzada com outros membros do gênero *Flavivirus* dificulta o uso de técnicas como ELISA, sendo o teste de neutralização de redução de placa (PRNT) o mais indicado para identificar a presença de anticorpos para o ZIKV (Petersen *et al.*, 2016).

O diagnóstico molecular envolve a detecção de RNA viral por RT-PCR a partir de diferentes fluidos, tais como, soro, saliva, sêmen, amostra de cordão umbilical, urina, cotonete nasofaríngeo, líquido amniótico, secreções vaginais (Paz-Bailey *et al.*, 2018). Paz-Bailey e colaboradores (2018) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a persistência do vírus em soro, urina, sêmen, saliva e secreções vaginais. Foi verificado que a média de detecção do vírus em urina foi de oito dias enquanto que em sêmen foi de 34 dias. Amostras de saliva e secreções vaginais apresentaram baixa detecção quando comparada com outros fluidos (Paz-Bailey *et al.*, 2018).

A viremia do ZIKV, caracterizada pela presença do vírus no sangue, é baixa em humanos (Ozkurt e Tanriverdi, 2017). Em amostras de sangue, a detecção do RNA viral por PCR pode ser realizada em até 10 dias após o aparecimento dos sintomas, enquanto que em urina e sêmen a detecção do vírus apresenta-se com um tempo maior, como pode ser visto em três semanas (Ozkurt e Tanriverdi, 2017), podendo chegar a seis

meses após o início dos sintomas (Nicastri *et al.*, 2016). O ZIKV demonstra capacidade de transmissão via sexual (Arsuaga *et al.*, 2016; Nicastri *et al.*, 2016). Estudos evidenciaram que o vírus apresentou suscetibilidade de replicação em diferentes linhagens celulares do trato urogenital (Way *et al.*, 1976; Digoutte *et al.*, 1992; Chan *et al.*, 2016). A persistência do ZIKV em diferentes fluidos corporais, como a urina, deve ser esclarecida a fim de entender sua validade como teste diagnóstico (Moulin *et al.*, 2016).

Amostras de urina e saliva de pacientes sintomáticos foram isoladas com sucesso em linhagem celular Vero, células de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) (Bonaldo *et al.*, 2016). Após métodos de detecção e quantificação do RNA viral, foi observado que os títulos presentes em urina foram superiores (Bonaldo *et al.*, 2016). No entanto, é importante a ressalva de que a sua detecção no fluido não está diretamente relacionada a capacidade infecciosa do vírus no fluido. Detecção de RNA viral em amostras de urina mostrou ser mais eficiente no diagnóstico de pacientes que retornavam de local endêmico, uma vez que o vírus se mostrou presente por mais tempo do que em sangue (Shinohara *et al.*, 2016). Um relatório sugere que a virúria (presença do vírus na urina) pode ser observada em mais de 15 dias após o início dos sintomas (Roze *et al.*, 2016). Dessa forma, amostras de urina são frequentemente utilizadas para diagnóstico por ser um método não invasivo e por apresentarem um tempo de circulação do vírus superior ao verificado em soro (Paz-Bailey *et al.*, 2018).

1.10 Epidemiologia de arboviroses no município de Mirassol

Mirassol é um município brasileiro localizado na região noroeste do estado de São Paulo a 453 km da capital São Paulo e a 15 km de São José do Rio Preto (IBGE/2018). Localiza-se a uma latitude 20°49'07" sul e a uma longitude 49°30'30" oeste, estando a uma altitude de 587 metros (IBGE/2018). Estima-se que a cidade apresente no ano de 2018 uma população de 59.333 habitantes (IBGE/2018). Em seu último censo, a cidade apresentava a quantidade de 53.792 habitantes localizados em uma área de aproximadamente 245 km², apresentando, assim, uma densidade demográfica de 221,10 hab/km² (IBGE/2010). Além disso, da área do município de Mirassol, 19% (47,07 km²) apresenta-se como área urbana com 97% da população residentes, enquanto que 3% da população residem na área rural, que corresponde a 81% (197,93 km²) do território. No ano de 2018, o município ainda é constituído por dois distritos: Mirassol e Ruilândia (IBGE).

Apresenta 97.7% de domicílios com esgotamento sanitário adequado, 97.9% de domicílios urbanos em vias públicas com arborização e 11% de domicílios urbanos em vias públicas com urbanização adequada (presença de bueiro, calçada, pavimentação e meio-fio) (IBGE/2018).

Atualmente na plataforma *PubMed*, encontram-se apenas três estudos a respeito da circulação de arboviroses no município de Mirassol, sendo o mais atual datado do ano de 2008. Deles, dois apresentam métodos de captura de mosquitos do gênero *Aedes* como forma de controle da circulação do vetor, enquanto que apenas um avaliou a relação de casos de Dengue com a presença dos vetores. O primeiro ressalta que o município apresentou infestação por mosquitos do gênero *Aedes* pela primeira vez em 1987 (Dibo *et al.*, 2005). A primeira transmissão de Dengue reportada no município foi em 1993, com um índice de 67/100.000 casos no mesmo ano (Dibo *et al.*, 2005). Além disso, Dibo e colaboradores (2005) apresentam dados que mostram que locais ao ar livre apresentam-se como melhores sítios para instalação de armadilhas para captura de mosquitos do gênero *Aedes* comparado com locais internos em residências do município (Dibo *et al.*, 2005). Contudo, Fávaro e colaboradores (2006) apontam não haver diferença significativa acerca do local de instalação de MosquiTRAPs comparando locais internos e ao ar livre. Os pesquisadores acentuam a importância da utilização de armadilhas contra os vetores como ferramenta de vigilância epidemiológica (Favaro *et al.*, 2006). O terceiro mostrou por meio de coletas semanais de ovos, larvas e adultos de mosquitos no município de Mirassol nos anos de 2004 e 2005, que o número de coletas foi mais frequente em períodos de temperatura e índices pluviométricos mais elevados, correspondendo aos meses de Dezembro a Fevereiro apresentando relação com os casos de Dengue relatados no mesmo período (Dibo *et al.*, 2008).

A coleta de exemplares de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* pelo Centro de Vigilância Epidemiológica (2018) do município permite avaliar os níveis de infestação do município mostraram um índice de Breteau (o número de recipientes reprodutores com larvas de *Aedes aegypti* e/ou *Aedes albopictus* dividido pelo número total de casas inspecionadas multiplicadas por 100) (PAHO, 1994) como indicados na Tabela 1. Tais medições são realizadas por meio das atividades de Avaliação de Densidade Larvária (ADL) e Levantamento Rápido do Índice de Infestação por *Aedes aegypti* (LIRAA) que tem por objetivo a medição do Índice de Breteau.

De acordo com o índice de Breteau, valores inferiores a 1% apresentam grau satisfatório de avaliação, entre 1 – 3,9% coloca o município em condição de alerta a

infestação de vetores do gênero *Aedes*, quando superior a 4% é indicado como risco de surto (Brasil, 2013). Dessa forma, a investigação de arbovirose na cidade de Mirassol apresenta grande importância devido a sua alta exposição à circulação do vetor como atestado pelos índices de Breteau calculados nos anos de 2016 a 2018 (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação do Índice de Breteau nos anos de 2016, 2017 e 2018 no município de Mirassol.

Ano	Atividade	Mês	Índice de Breteau (%)
2016	LIRAA	Janeiro	4,5
	ADL	Março	2,7
	ADL	Julho	0,5
	LIRAA	Novembro	4,1
2017	LIRAA	Janeiro	11,2
	ADL	Junho	2
	ADL	Agosto	0,9
	LIRAA	Outubro	2,3
2018	LIRAA	Janeiro	7,3
	ADL	Abril	4
	ADL	Julho	1,1
	LIRAA	Outubro	4

Fonte: Centro de Vigilância Epidemiológica de Mirassol (dados não publicados)

Mirassol é uma cidade endêmica para Dengue, assim como outras cidades vizinhas no noroeste paulista (Centro de Vigilância Epidemiológica/2018). A presença de casos de Dengue já confirmados no passado apresenta-se como um dado importante a fim de avaliar os riscos que uma população já exposta a outros arbovírus pode apresentar em um novo surto de ZIKV ainda não registrado na localidade.

O vírus Zika se espalhou rapidamente pelo mundo (Baud *et al.*, 2017). Seu quadro sintomático auto-limitante, a apresentação de sinais clínicos similares a outros arbovírus somados a uma infecção com sintomas brandos ou muitas vezes com pacientes assintomáticos geram dados de prevalência subestimados (Villa, 2016; Braga *et al.*, 2017). Por outro lado, testes sorológicos podem produzir resultados falso-positivos devido à reatividade cruzada com outros flavivírus, podendo gerar uma superestimação de casos (Zimmerman *et al.*, 2018). Devido a essas complicações, novos estudos devem focar na elucidação de possíveis formas de monitoramento e diagnóstico em fluídos que apresentem prevalência superior quando comparadas com outros locais. Aumentando assim, a possibilidade de identificar e gerar dados de vigilância da saúde.

Somado a esses fatores, os estudos realizados até o momento majoritariamente focada na detecção de ZIKV em pacientes sintomáticos (Moreira *et al.*, 2017). Uma vez reportado que cerca de 80% das pessoas infectadas pelo vírus não apresentam sintomas, o presente estudo previu também a coleta de amostras de urina de pacientes sem sintomas clínicos na cidade de Mirassol/SP como forma de oferecer um prognóstico mais eficaz aos pacientes e fornecer dados epidemiológicos à região.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar molecular, temporal e espacialmente a presença de ZIKV em amostras de pacientes sintomáticos e sem sintomas clínicos para arboviroses.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar a presença de ZIKV em amostras de soro e urina de pacientes sintomáticos;
- Investigar a presença de ZIKV vírus em amostras de urina de pacientes sem sintomas clínicos para arboviroses;
- Analisar o quadro de sintomas dos pacientes com a presença do ZIKV por meio de questionários;
- Analisar a distribuição temporal do ZIKV por meio de coletas mensais;
- Analisar a distribuição espacial do ZIKV no município de Mirassol por meio de geoprocessamento em bairros dos municípios dos pacientes inseridos no estudo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE – UNESP) de São José do Rio Preto – SP (CAAE: 66489617.4.0000.5466).

3.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Foi entregue a todos os pacientes incluídos no estudo o TCLE (Anexo A), documento através do qual os pacientes puderam esclarecer qualquer dúvida acerca dos riscos e benefícios da pesquisa diretamente com o pesquisador responsável.

A coleta das amostras de urina e sangue total ocorreu após a assinatura do TCLE pelos participantes. Foram tomados todos os cuidados éticos como proteção ao sigilo, preservação do constrangimento, prevenção dos riscos que pudessem ter sido gerados pelos procedimentos da pesquisa durante a coleta do material. Também foi questionado no momento da coleta aos pacientes se eles apresentaram algum dos sintomas

apresentados no questionário e há quanto tempo (dias) os sintomas se iniciaram, levando em consideração o dia da coleta (Anexo B.).

3.3 Casuística e processamento das amostras

Para o presente estudo, os pacientes foram separados para posterior análise em dois grupos, sendo o primeiro composto por pacientes sintomáticos para arbovirose. O critério de inclusão para este grupo foi determinado por análise clínica realizada por médicos da Unidade de Pronto Atendimento de Mirassol/SP (UPA – Mirassol) por meio de exames de sangue realizados no momento da coleta. Os pacientes sintomáticos foram notificados para Dengue na UPA segundo instrução da Secretaria de Saúde do município e amostras de sangue total e urina foram coletadas. As coletas para o grupo de pacientes sintomáticos foram realizadas no período de 26 de fevereiro de 2018 a 18 de dezembro de 2018.

O segundo grupo foi composto por pacientes presentes na UPA – Mirassol, que segundo avaliação médica, não apresentaram evidência clínica de infecção por arbovírus ou acompanhantes de pacientes. Foram coletadas apenas amostras de urina dos indivíduos incluídos neste grupo no período de 26 de março de 2018 a 19 de novembro de 2018. Foram tomadas todas as medidas cabíveis a fim de evitar constrangimento ao voluntário durante a coleta. A codificação dos pacientes ocorreu no momento da entrada no estudo com a numeração dos pacientes por meio das iniciais MXXX para os sintomáticos e MAXXX para os sem sintomas clínicos.

3.4 Processamentos das amostras

Após as coletas, as amostras de sangue e urina foram direcionadas ao Laboratório de Estudos Genômicos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de São José do Rio Preto/SP (IBILCE/UNESP), onde foram processadas de acordo com o descrito abaixo.

Urina

No laboratório, foram adicionados 40 mL de amostra de urina em tubos estéreis e identificados com a numeração do respectivo voluntário. Os tubos foram centrifugados a 448 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação foram descartados os sobrenadantes e reservados 2 mL de urina concentrada com o *pellet* formado. A urina concentrada foi filtrada em filtros de malha de 45 nm com a

utilização de seringas de 5 mL com o propósito de eliminar qualquer possível contaminação e separação de bactérias no fluido estocado. O processamento teve como finalidade obter a maior quantidade de material suspenso na urina em uma amostra concentrada, que foi direcionada a extração de RNA. Posteriormente, as amostras foram armazenadas a -150°C .

Soro

As amostras de sangue foram coletadas em tubos de coleta com gel separador ativador de coágulo (tampa amarela). Ao chegar ao laboratório, esses tubos foram submetidos à centrifugação a $1008 \times g$ por 15 minutos para separação do soro (sobrenadante), que foi armazenado em tubos próprios a fim de realizar extração de cada porção. As alíquotas foram estocadas em freezer -150°C .

3.5 Extrações de RNA

Para extração do RNA, 250 μL de amostras de urina concentrada e de soro foram adicionadas em 750 μL de solução monofásica de tiocianato de guanidina e fenol (TRIzol - Life Technologies®). Em seguida foram adicionados 200 μL de clorofórmio as amostras, sendo misturadas com auxílio de um agitador para tubos do tipo vórtex por alguns segundos, e posteriormente incubadas a temperatura ambiente por três minutos.

As amostras foram então centrifugadas a 4°C por 15 minutos a $21952 \times g$. Em seguida, a fase superior formada foi transferida para um novo tubo, no qual foram adicionados 500 μL de isopropanol absoluto (Merck Millipore®). Os tubos foram invertidos 15 vezes, incubados por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugados a $21952 \times g$ durante 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi então removido, de forma a não descolar o pellet de RNA formado. Para a lavagem do RNA, foi adicionado 1mL de etanol 75% (Merck Millipore®), sendo então centrifugado a 4°C por 5 minutos a $11200 \times g$. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o RNA foi inserido no equipamento *Concentrator 5301* (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) para secagem a vácuo por aproximadamente 5 minutos. Por fim, os RNAs extraídos foram ressuspendido em 20 μL de água tratada com o reagente dietil pirocarbonato (DEPC - Sigma Aldrich®) e armazenado a -150°C .

3.6 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

Para investigação da presença ou ausência de RNA de ZIKV, foram realizados ensaios de PCR em Tempo Real (qPCR, ou PCR quantitativo) a partir das amostras de RNA extraídos segundo Laciotti e colaboradores (2008) com protocolo *OneStep* utilizando o kit *GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega Corporation, Madison, EUA)*. A sonda e os primers utilizados estão descritos na Tabela 2. Foi preparada uma mistura contendo o volume e a concentração final de cada reagente indicado na Tabela 3 para um volume final de 15µL.

Tabela 2. Sonda e Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de OneStep-qPCR para detecção de ZIKV.

Nome	Sequência 5'-3'
ZIKV 1086	CCGCTGCCCAACACAAG
ZIKV 1162c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT
ZIKV 1107-SONDA	[6FAM]AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA[BHQ1]

Fonte: (Lanciotti *et al.*, 2008).

Para isso, inicialmente preparou-se o mix, utilizando o kit *GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega Corporation, Madison, EUA)*, em capela de fluxo laminar previamente esterilizada por luz ultravioleta. Para cada amostra, foi montada uma reação com volume final de 20 µL contendo: 10 µL de *GoTaq® Probe qPCR Master Mix, CXR Reference Dye* (33,4 µL para cada 1 mL do reagente anterior), 0,5 µL de *Nuclease-Free Water*, 0,25 µM de sonda (ZIKV 1107), 0,9 µM de cada primer (*forward e reverse*) e 0,4 µL de *GoScript™ Reverse Transcription Mix*. Além disso, em um pocinho foi colocado apenas o mix, servindo como controle negativo da reação e, outro, adicionou-se RNA viral extraído de uma cepa de ZIKV brasileiro em cultura de células como controle positivo, com a finalidade de validar tal experimento.

Em seguida, 15 µL deste mix foram distribuídos nos pocinhos da placa *Applied Biosystems™ 96-Well* e, ainda, acrescentou-se 5 µL da amostra de RNA nos respectivos pocinhos (anteriormente definidos). A placa foi vedada com um adesivo próprio e centrifugada por 1 minuto a 11200 x g para homogeneizar o preparo. Por fim, a reação foi submetida ao equipamento *QuantStudio™ 12K Flex Real Time PCR System (Applied Biosystems™, Foster City, EUA)*, de acordo com a ciclagem estabelecida na Tabela 3.

Tabela 3. Etapas da ciclagem da mistura do preparado para PCR em Tempo Real para ZIKV.

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tempo
Transcriptase reversa	1	45°C	15 minutos
Inativação da transcriptase reversa e ativação da <i>GoTaq® DNA Polymerase</i>	1	95°C	2 minutos
Desnaturação	45	95°C	15 segundos
Anelamento e extensão		60°C	1 minuto

Fonte: *GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega Corporation, Madison, EUA)*

Para as amostras de soro e urina que apresentaram resultados positivos para presença de RNA de ZIKV no grupo de pacientes sintomáticos, foram realizados ensaios de PCR em Tempo Real Multiplex (*Fourplex*) para detecção de possíveis coinfeções por DENV segundo (Johnson *et al.*, 2005).

3.7 Acompanhamentos de pacientes positivos

Depois de realizada a detecção da presença do ZIKV, os pacientes foram informados acerca do seu diagnóstico positivo. O procedimento se deu por meio da reconvocação do paciente a UPA de Mirassol, onde os pacientes receberam explanação sobre o quadro clínico da doença e esclarecimento de dúvidas sobre possíveis danos futuros. Para nova interpretação dos resultados, o presente estudo se preocupou em reavaliar o diagnóstico dos pacientes em período futuro a data da primeira coleta. Para isso, foi solicitado aos pacientes interessados em continuar no nosso plano de estudo que coletassem novas amostras de urina, sangue e sêmen (para os pacientes do sexo masculino).

3.8 Confeções de mapas georreferenciados para avaliação da distribuição de ZIKV no município

As coordenadas geográficas das residências dos pacientes positivos para ZIKV foram obtidas a partir do seu registro de endereço contido no TCLE assinado durante a coleta das amostras na UPA. Os limites geográficos do município foram plotados em um mapa georreferenciado digital do município de Mirassol e demais localidades apontadas como residência dos pacientes positivos para ZIKV, baseado no mapa obtido junto a plataforma *OpenLayers*. As atividades de plotagem e tratamento dos mapas digitais foram efetuados utilizando o programa *QGIS Bonn* versão 3.2 (Qgis, 2018).

3.9 Análises Estatísticas

Os dados categóricos de sintomas apresentados no momento da coleta foram analisados por meio de Teste Exato de Fisher onde foi adotado $p < 0,5$ para verificar se havia alguma associação entre as manifestações clínicas e laboratoriais dos pacientes com a presença do ZIKV entre os grupos de pacientes analisados.

Todos os dados foram tabulados e analisados no programa R (versão 3.5.2).

4. RESULTADOS

4.1 Pacientes sintomáticos

Foram coletadas amostras de sangue e urina de 141 pacientes sintomáticos para arboviroses na UPA de Mirassol/SP, sendo 87 (61,7%) pacientes do sexo feminino e 54 (38,3%) do sexo masculino. Em relação à idade dos pacientes sintomáticos, a maioria do sexo feminino (51,8%) encontrou-se na faixa de 30 a 59 anos, enquanto que para o sexo masculino 55,6% dos pacientes encontra-se na faixa de 0 a 30 anos (Tabela 4). A média de idade para o sexo feminino foi 31,1 anos, para o sexo masculino a média foi de 33,9 anos (Tabela 4.).

Tabela 4. Dados epidemiológicos dos 141 pacientes sintomáticos para arboviroses.

	Feminino (n=87)	Masculino (n=54)	Total (n=141)
0 > 30 anos	32 (36,8%)	30 (55,6%)	62 (44%)
30 > 60 anos	45 (51,8%)	15 (27,8%)	60 (42,5%)
> 60 anos	5 (5,7%)	7 (13%)	12 (8,5%)
Sem dados	5 (5,7%)	2 (3,6%)	7 (5%)
Média de idade	31,1 anos	33,9 anos	32,8 anos

Fonte: Do autor.

Dos 141 pacientes analisados, 124 (87,9%) coletaram amostras de sangue e urina, 11 (7,8%) pacientes coletaram apenas sangue e seis (4,3%) coletaram apenas urina.

Das 135 amostras de sangue coletadas, dez amostras (7,4%) foram positivas para ZIKV. Enquanto que das 130 amostras de urinas testadas, seis (4,6%) apresentaram-se positivas para ZIKV.

As 16 amostras de soro e/ou urina positivas para ZIKV foram proveniente de 14 pacientes sintomáticos. Desses, oito pacientes apresentaram-se positivos apenas no soro, enquanto quatro foram positivos apenas na urina. Além disso, dois pacientes foram positivos em ambos os fluídos (Tabela 5). Embora tenha sido destacado que houve pacientes que coletaram apenas sangue ou urina, todos os pacientes positivos para ZIKV coletaram ambos os fluidos.

Tabela 5. Quantidade de pacientes positivos para ZIKV de acordo com os fluidos.

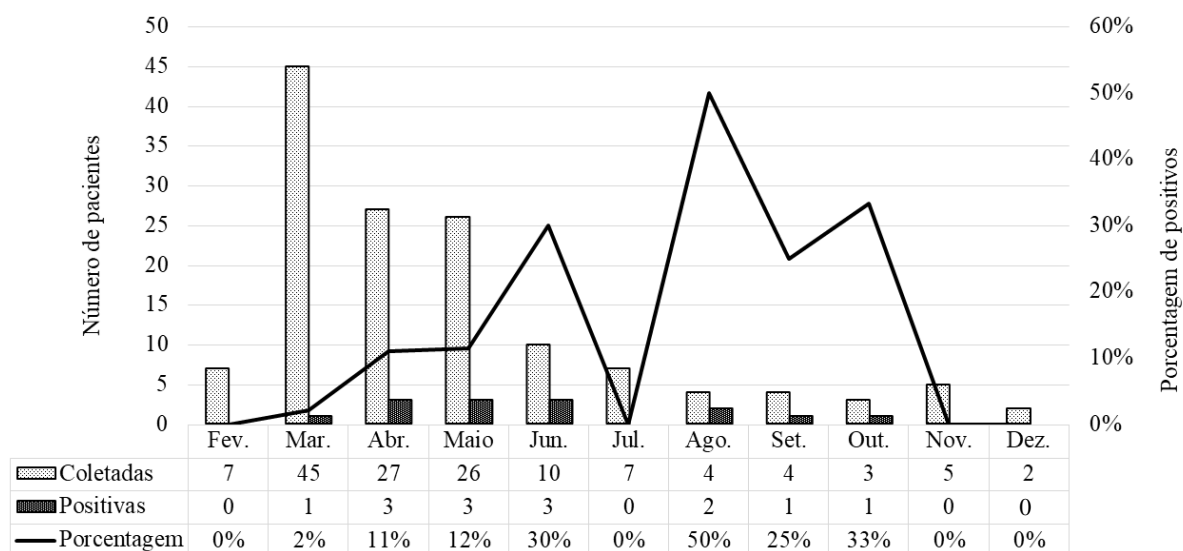
Fluido	Quantidade de pacientes
Sangue e urina	2 (14,3%)
Soro	8 (57,1%)
Urina	4 (28,6%)

Fonte: Do autor.

Dessa forma, dos 141 pacientes sintomáticos para arboviroses, 14 foram positivos para ZIKV, representando 9,9% dos pacientes inseridos no grupo de pacientes sintomáticos. Dos pacientes positivos, 10 (71,4%) foram do sexo feminino e quatro (28,6%) do sexo masculino.

A Figura 3 apresenta a quantidade de amostras coletadas e positivas para cada mês. Os meses com maior números de coletas foram os meses de Março (n=45), Abril (n=27) e Maio (n=26). Em seguida, houve uma diminuição do número de coletas no mês de Junho (n=10), Julho (n=7), Agosto (n=4), Setembro (n=4), Outubro (n=3), Novembro (n=5) e Dezembro (n=5). A quantidade de amostras positivas para ZIKV permaneceu constante durante Abril a Junho, três casos positivos em cada mês. O mês de Julho não apresentou nenhum caso positivo para o vírus. O mês de Agosto apresentou 50% de casos positivos dentre os quatro pacientes coletados. Setembro e Outubro apresentaram apenas um caso positivo em cada mês. Os meses de Novembro e Dezembro não apresentaram nenhum caso positivo (Figura 3).

Figura 3. Número de amostras coletadas e amostras positivas por mês dos pacientes sintomáticos.



Fonte: Do autor.

Na Tabela 6 estão apresentados os sintomas reportados pelos pacientes positivos para ZIKV. É possível verificar que os sintomas mais prevalentes foram os de dores musculares (71%, n=10), febre (64%, n=9) e dor nos olhos (57%, n=8) como os principais sintomas no momento da coleta.

Tabela 6. Quantidade de dias de sintomas apresentados pelos pacientes positivos para ZIKV. Amarelo: pacientes positivos apenas em urina; rosa: pacientes positivos apenas em soro; azul: pacientes positivos em soro e urina; d: dias; - : não apresentou sintomas e x : apresentou sintomas, mas não se recorda há quantos dias.

Referência	Sintomas									
	Febre	Enjoo	Vômito	Olhos vermelhos	Dor nos olhos	Intolerância a luz	Cocceira	Manchas na pele	Dores musculares	Dores nas juntas
M048	-	-	-	-	-	-	3d	-	3d	-
M062	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M073	2d	-	-	-	2d	-	2d	2d	2d	2d
M128	2d	x	-	-	2d	-	-	2d	-	-
M078	3d	3d	-	-	1d	-	-	-	3d	-
M089	1d	-	-	-	1d	-	-	-	1d	-
M093	x	-	-	-	-	-	-	-	x	x
M098	2d	-	-	-	2d	2d	-	1d	-	-
M107	5d	5d	5d	-	2d	2d	1d	-	5d	5d
M110	5d	-	-	7d	7d	7d	5d	7d	7d	7d
M111	4d	-	-	-	4d	-	4d	4d	4d	-
M133	-	-	-	-	-	-	4d	-	-	-
M124	-	1d	1d	-	-	-	-	-	2d	2d
M125	-	-	-	-	-	-	-	-	5d	5d

Fonte: Do autor.

Análises de possível coinfeção foram realizadas em 126 pacientes sintomáticos. Desses, 8,7% (11) apresentaram coinfectados por ZIKV/DENV-2.

Das 14 amostras positivas para ZIKV de pacientes sintomáticos avaliadas para possível coinfeção, 11 (78,6%) apresentaram-se coinfectadas com DENV-2, sendo detectados três casos de coinfeção na urina e sete casos de coinfeção no soro (Tabela 7).

Tabela 7. Dados de coinfeção de ZIKV e DENV-2. Cor azul: ZIKV (urina) – DENV-2 (soro e urina); rosa: ZIKV (soro) – DENV-2 (soro); roxo: ZIKV (soro) – DENV-2 (soro e urina) e amarelo: ZIKV (urina) – DENV-2 (soro).

Referência	ZIKV		DENV2	
	Soro	Urina	Soro	Urina
M0048	-	+	+	+
M0062	-	+	+	+
M0073	-	+	+	+
M0078	+	-	+	-
M0089	+	-	+	-
M0093	+	-	+	-
M0098	+	-	+	+
M0107	+	-	+	-
M0110	+	-	+	-
M0111	+	-	+	-
M0124	+	+	-	-
M0125	+	+	-	-
M0128	-	+	+	-
M0133	+	-	-	-

Fonte: Do autor.

4.2 Pacientes sem sintomas clínicos para arboviroses

Foram coletadas 457 amostras de urina de 447 pacientes sem sintomas clínicos para arboviroses na UPA de Mirassol/SP do período de 26/03/2018 a 19/11/2018 (alguns pacientes coletaram mais de uma vez). Dos pacientes coletados, 308 pacientes eram do sexo feminino (68,9%), enquanto 139 eram do sexo masculino (31,1%).

Em relação à idade dos pacientes sem sintomas clínicos para arboviroses, a maioria dos pacientes do sexo feminino (51,3%) e masculino (41,7%) encontra-se na faixa de 30 a 59 anos (Tabela 8). A média de idade para o sexo feminino foi 40,7 anos, para o sexo masculino a média foi de 42,5 anos (Tabela 8.).

Tabela 8. Dados epidemiológicos dos 447 pacientes sintomáticos para arboviroses.

	Feminino (n=308)	Masculino (n=139)	Total (n=447)
0 > 30 anos	82 (26,6%)	46 (33,1%)	128 (28,6%)
30 > 60 anos	158 (51,3%)	58 (41,7%)	216 (48,3%)
> 60 anos	61 (19,8%)	30 (21,6%)	91 (20,4%)
Sem dados	7 (2,3%)	5 (3,6%)	12 (2,7%)
Média de idade	40,7 anos	42,5 anos	41,9 anos

Fonte: Do autor.

Depois de realizado qPCR para ZIKV das 457 amostras, foi verificado que 30 foram positivas, representando 6,6% das amostras coletadas. Dos pacientes positivos, 20 (66,7%) foram do sexo feminino e 10 (33,3%) do sexo masculino.

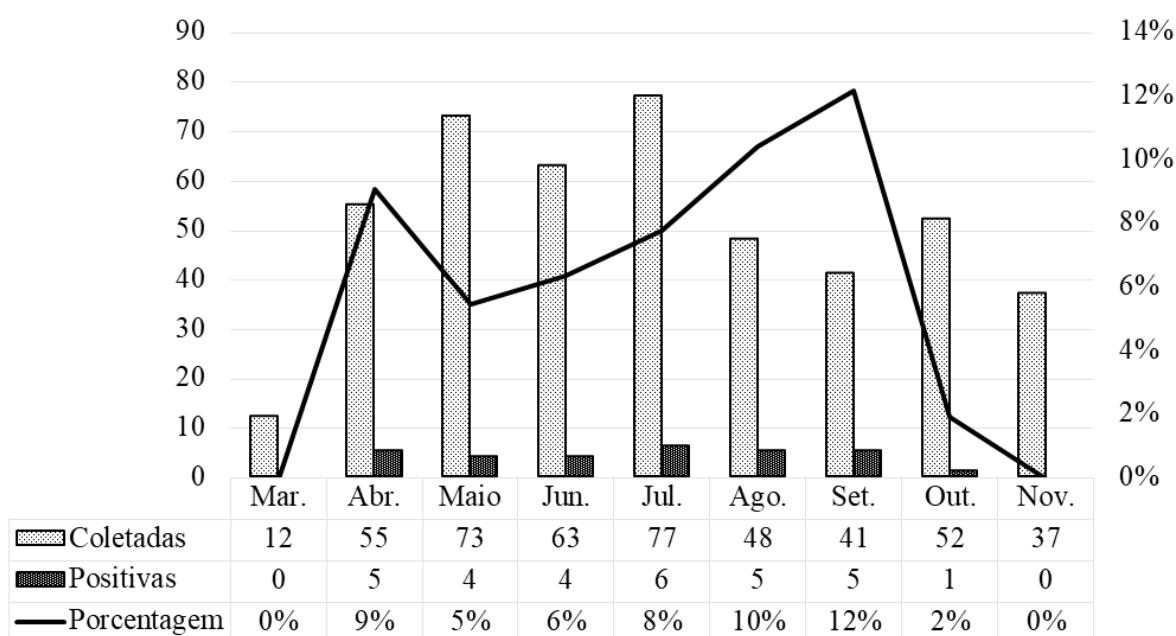
O número de coletas para o grupo de pacientes sem sintomas clínicos também foi analisada (Figura 4).

Foi possível verificar uma média de 50,8 pacientes coletados por mês no período de Abril a Novembro de 2018 (Figura 4). O número de pacientes positivos permaneceu constante entre o período de Abril a Setembro, apresentando uma média de 4,8 pacientes positivos por mês, no entanto, foram nos meses de Agosto e Setembro que a porcentagem de pacientes positivos apresentou-se maior, com uma média de 11,5% de pacientes positivos dentre os coletados.

Foi possível averiguar uma diminuição de casos positivos no mês de Outubro, onde apenas 2% dos pacientes coletados apresentaram-se positivos, seguido pelo mês de Novembro que nenhum dos pacientes foi positivo para ZIKV (Figura 4). No que se

referem aos sintomas apresentados pelos pacientes sem diagnóstico clínico para arboviroses no momento da coleta das urinas, verificou-se que 16 (66.7%) dos 30 pacientes positivos não apresentaram nenhum dos sintomas listados (Tabela 9). Os sintomas mais relatados por esse grupo de pacientes foram os de dores musculares (30%, n=9), enjoo (20%, n=6), febre (3%, n=5) (Tabela 9). Os sintomas de olhos vermelhos e intolerância a luz não foram listados por nenhum dos pacientes inseridos no estudo (Tabela 9).

Figura 4. Número de amostras coletadas e amostras positivas por mês dos pacientes sem sintomas clínicos para arboviroses.



Fonte: Do autor.

Tabela 9. Quantidade de dias de sintomas apresentados pelos pacientes sem sintomas clínicos para arboviroses positivos para ZIKV. d: dias; - : não apresentou sintomas e x : apresentou sintomas, mas não se recorda há quantos dias.

Referência	Sintomas									
	Febre	Enjoo	Vômito	Olhos vermelhos	Dor nos olhos	Intolerância a luz	Coceira	Manchas na pele	Dores musculares	Dores nas juntas
MA016	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MA018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MA025	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-
MA036	-	-	-	-	-	-	-	-	6d	-
MA065	2d	-	-	-	-	-	-	-	2d	-
MA076	4d	-	-	-	-	-	-	-	4d	-
MA083	2d	2d	-	-	2d	-	2d	2d	2d	2d
MA089	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MA098	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-
MA157	2d	2d	-	-	-	-	-	-	-	-
MA158	-	2d	2d	-	5d	-	-	-	5d	5d
MA159	5d	-	2d	-	5d	-	-	-	-	-
MA195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MA218	-	2d	-	-	-	-	-	-	2d	-
MA221	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MA229	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MA230	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MA264	-	-	-	-	-	-	-	-	3d	-
MA300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MA302	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MA303	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MA308	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MA317	-	2d	-	-	-	-	-	-	7d	-
MA328	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MA329	-	1d	2d	-	-	-	-	-	-	-
MA332	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MA344	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MA 364	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MA372	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MA205B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Do autor.

4.3 Análises dos pacientes positivos para ZIKV

Levando em consideração a somatória das 141 pacientes sintomáticos e das 447 pacientes sem sintomas clínicos para arboviroses inseridos neste trabalho, obtivemos um total de 588 indivíduos analisados. Destes, 44 (7,5%) foram positivos para ZIKV. A respeito do sexo dos pacientes, 30 (68%) foram do sexo feminino e 14 do sexo masculino (32%).

Em relação à idade dos pacientes positivos para ZIKV, a maior porcentagem (53,4%) das mulheres encontrou-se na faixa de 30 a 60 anos, enquanto que para os homens foi de 0 a 30 anos (42,8%) (Tabela 10). A média de idade registrada para todos os pacientes positivos foi de 36,6 anos (Tabela 10).

Tabela 10. Dados epidemiológicos dos 30 pacientes positivos para ZIKV.

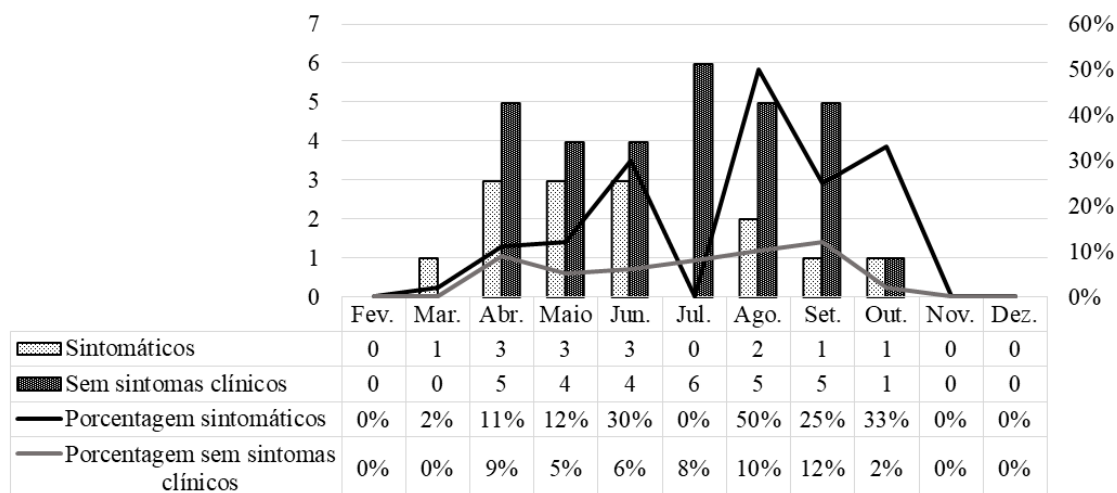
	Feminino (n=30)	Masculino (n=14)	Total (n=44)
0 > 30	9 (30%)	6 (42,8%)	15 (34,1%)
30 > 60	16 (53,4%)	5 (35,7%)	21 (47,7%)
> 60	2 (6,6%)	3 (21,5%)	5 (11,4%)
Sem dados	3 (10%)	0 (0%)	3 (6,8%)
Média	35,1 anos	39,2 anos	36,6 anos

Fonte: Do autor.

Dos pacientes positivos (n=44), 14 (32%) pertenciam ao grupo de pacientes sintomáticos e 30 (68%) do grupo de pacientes sem sintomas clínicos para arboviroses.

É possível analisar por meio da Figura 5 a quantidade de pacientes positivos sintomáticos e sem sintomas clínicos por mês e suas respectivas porcentagens em relação ao número de coletas mensais. Podemos visualizar que durante o período de Abril a Setembro, o número de pacientes positivos sem sintomas clínicos para arboviroses foi maior (n= 29) do que o número de sintomáticos (n=12). Essa diferença aumentou nos meses de Julho a Setembro comparado ao período de Abril a Junho (Figura 5). No entanto, em relação ao valor de porcentagem em relação ao número de coletas, o grupo de pacientes sintomáticos mostra-se superior aos de sem sintomas clínicos em todos os meses, menos no mês de Julho (Figura 5).

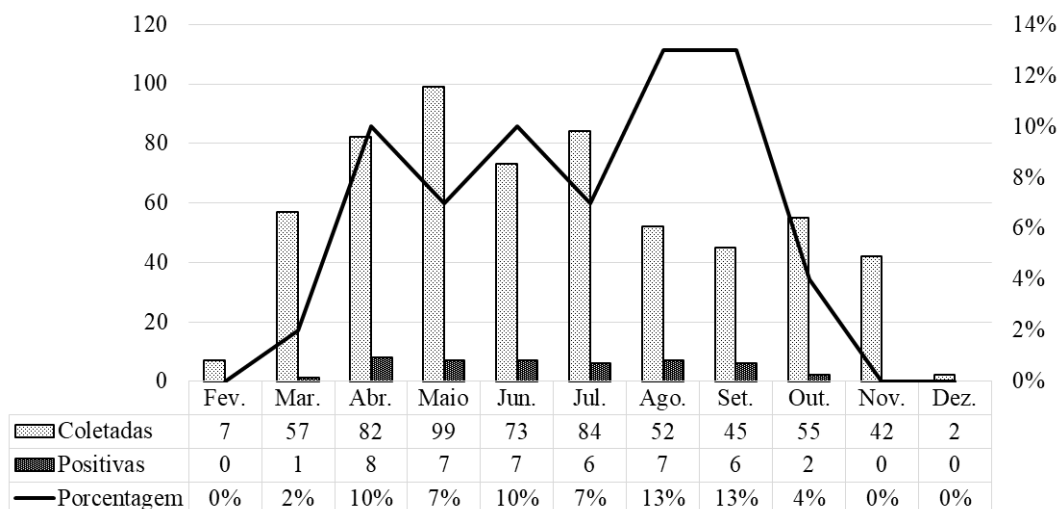
Figura 5. Número de pacientes positivos e respectiva porcentagem para ZIKV de acordo com o mês e com o quadro clínico apresentado no momento da coleta.



Fonte: Do autor.

A Figura 6 apresenta a quantidade de amostras coletadas e positivas para ZIKV dentre as 588 analisadas. É possível assim, avaliar que o número de amostras infectadas por ZIKV apresentou-se constante entre os meses de Abril a Setembro, variando entre 6 a 8 amostras positivas com uma média de 6,8 pacientes infectados pelo vírus por mês durante esses meses. Somados os números de coletas dos grupos de pacientes sintomáticos e sem sintomas clínicos para arboviroses, o mês de Agosto e Setembro foram os que apresentaram maior frequência de casos positivos em relação ao número de coletas no mês (Figura 6).

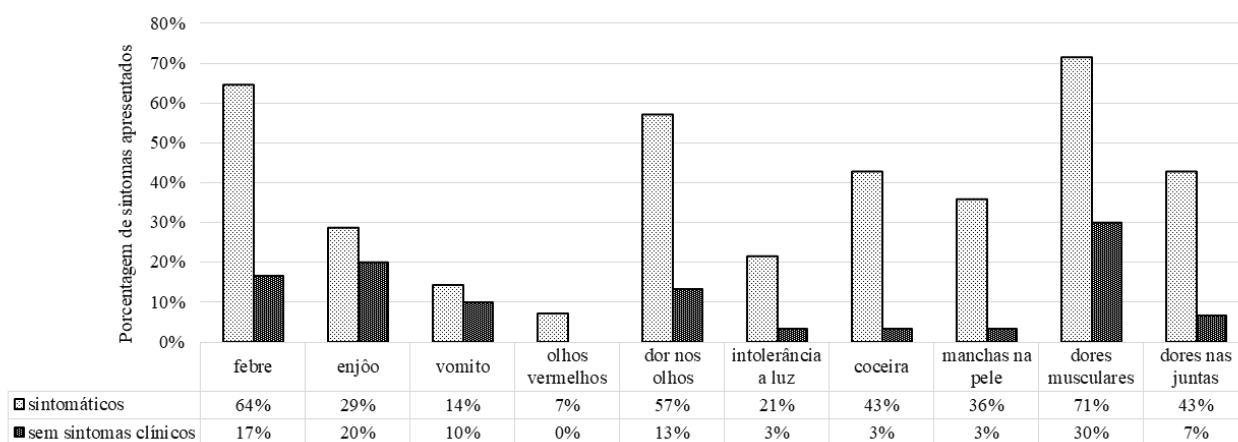
Figura 6. Número de amostras coletadas e amostras positivas por mês de todos os pacientes inseridos no estudo.



Fonte: Do autor.

É possível visualizar na Figura 7 a diferença dos sintomas declarados pelos pacientes no momento da coleta de acordo com o seu grupo de quadro sintomático. Dores musculares, febre e dores nos olhos foram os mais declarados pelos pacientes sintomáticos: 71%, 64% e 57%, respectivamente, enquanto que apenas 30%, 17% e 13%, respectivamente, dos pacientes sem sintomas clínicos apresentaram os mesmos sintomas (Figura 7). Além disso, todos os sintomas apresentados no questionário obtiveram no máximo 30% de incidência nos pacientes sem sintomas clínicos. Dentre os 10 sintomas questionados, seis foram declarados por 10% ou menos no grupo de pacientes sem sintomas clínicos para arboviroses (vômito, olhos vermelhos, intolerância a luz, coceira, manchas na pele e dores nas juntas). Enquanto que cinco dos sintomas presentes no questionário apresentaram pelo menos 43% de incidência nos pacientes sintomáticos (febre, dor nos olhos, coceira, dores musculares e dores nas juntas) (Figura 7).

Figura 7. Porcentagem de sintomas declarados no momento da coleta por pacientes sintomáticos e sem sintomas clínicos para arboviroses positivos para ZIKV.



Fonte: Do autor

Por meio do teste exato de Fisher, pode-se avaliar que os sintomas que foram estatisticamente mais prevalentes nos pacientes positivos sintomáticos para ZIKV foram os de febre (64% vs. 17%, valor de $p < 0,05\%$), dor nos olhos (57% vs. 13%, valor de $p < 0,05\%$), coceira (43% vs. 3%, valor de $p < 0,05\%$), manchas na pele (36% vs. 3%, valor de $p < 0,05\%$), dores musculares (71% vs. 30%, valor de $p < 0,05\%$) e dores nas juntas (43% vs. 7%, valor de $p < 0,05\%$) (Tabela 11).

Tabela 11. Sinmatologia dos pacientes positivos para arboviroses inseridos no estudo.

Sintomas	Total n=44		ZIKV positivo (sintomáticos) n=14		ZIKV positivo (sem sintomas clínicos) n=30		valor de p
	n	%	n	%	n	%	
Febre	14	47	9/14	64	5/30	17	<0,05
Enjoo	10	33	4/14	29	6/30	20	0,7013
Vômito	5	17	2/14	14	3/30	10	0,6467
Olhos vermelhos	1	3	1/14	7	0/30	0	0,3182
Dor nos olhos	12	40	8/14	57	4/30	13	<0,05
Intolerância a luz	4	13	3/14	21	1/30	3	0,0878
Coceira	7	23	6/14	43	1/30	3	<0,05
Manchas vermelhas	6	20	5/14	36	1/30	3	<0,05
Dores musculares	19	63	10/14	71	9/30	30	<0,05
Dores nas juntas	8	27	6/14	43	2/30	7	<0,05

O valor de p foi calculado utilizando teste exato de Fisher.

Fonte: Do autor.

4.4 Acompanhamentos de pacientes positivos

Dentre os 14 pacientes sintomáticos positivos para ZIKV reconvocados, apenas um do sexo masculino e um do sexo feminino compareceram, os dois coletaram apenas novas amostras de sangue. Os dois pacientes apresentaram-se negativos em novo exame. O paciente M62 realizou a nova coleta três meses e 23 dias após a primeira, enquanto que o paciente M78 realizou três meses depois.

Dos 30 pacientes positivos sem sintomas clínicos da UPA Mirassol, quando reconvocados e apenas um paciente esteve presente, obtivemos a presença de um paciente do sexo masculino que coletou apenas amostra de urina três meses e 22 dias depois, sendo reavaliado como negativo para ZIKV e um do sexo feminino cuja amostra de urina coletada ainda não foi testada.

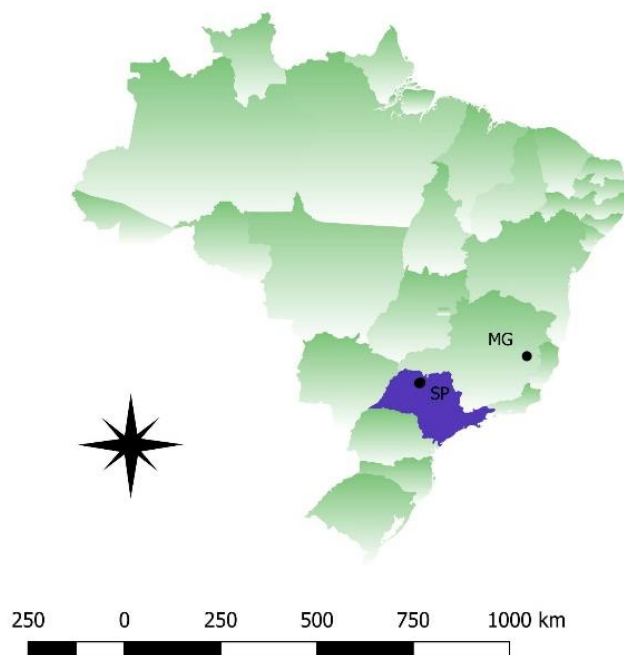
Durante os períodos de coleta na UPA, pacientes já ingressos no grupo de estudo que apresentassem interesse em coletar novas amostras foram incluídos como o Referencial de MA***B (indicando segunda coleta e MA devido a assintomacidade no momento da coleta). Destacamos o caso excepcional do paciente MA205. No dia 02/07/2018 o paciente coletou amostra de urina alegando aparecimento de febre há 15 dias. Sua amostra de urina foi apontada como negativa para RNA de ZIKV nessa data. Na semana seguinte, no dia 10/07/2018, o mesmo paciente retornou a UPA para nova consulta. Nessa data foi coletada nova amostra de urina, dessa vez ele não alegou a

presença de nenhum dos sintomas citados no questionário. No entanto, para a sua segunda coleta, a urina apresentou-se positiva para ZIKV.

4.5 Distribuição temporal e espacial de ZIKV

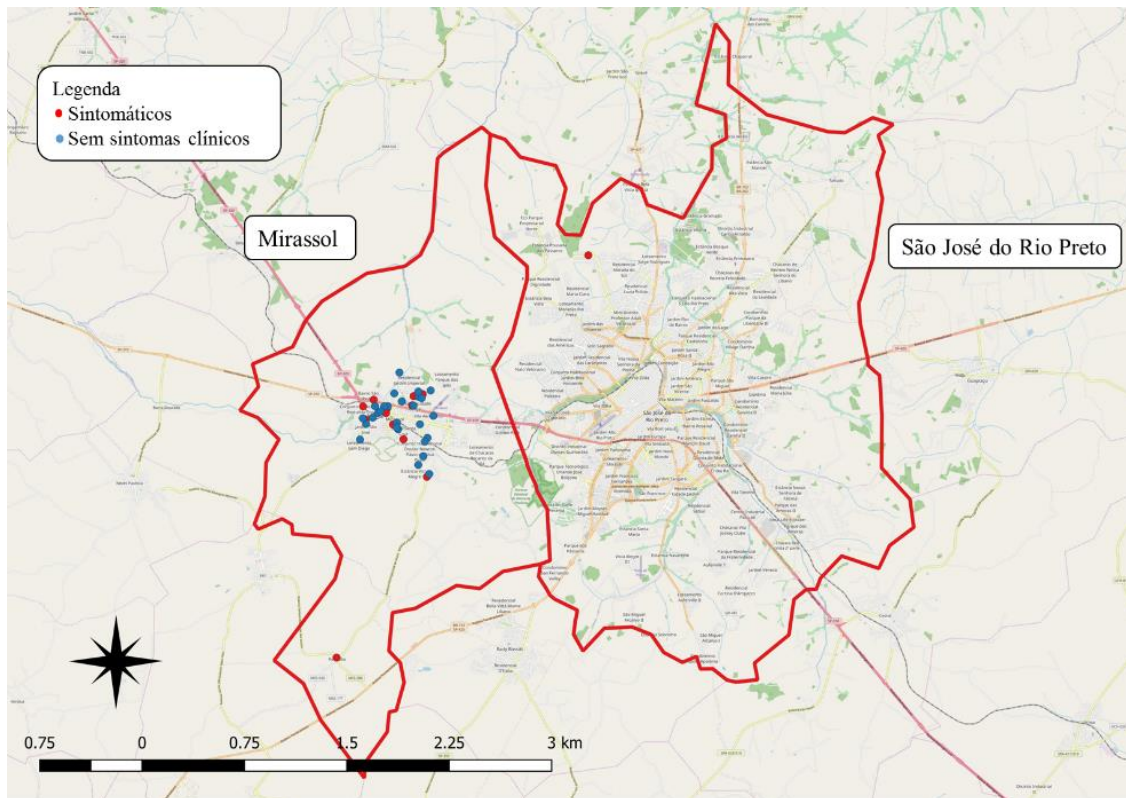
Com auxílio de mapas georreferenciados, foi possível analisar a distribuição do ZIKV de acordo com as coordenadas geográficas da residência dos pacientes positivos. Ao todo foi possível localizar 41 dos 44 pacientes positivos para ZIKV. Dos 41 pacientes positivos para ZIKV localizados, 39 eram residentes do município de Mirassol/SP, um paciente do município de São José do Rio Preto/SP e um paciente residente do estado de Minas Gerais (Figura 8 e 9).

Figura 8. Distribuição dos pacientes positivos no interior do Brasil.



Fonte: Do autor

Figura 9. Distribuição dos pacientes positivos no interior do estado de São Paulo.



Fonte: Do autor.

Dos 39 residentes do município de Mirassol/SP, a Figura 10 apresenta 38 pontos representando as residências dos pacientes no interior da cidade. Ao todo, 21 bairros apresentaram a presença de ZIKV. Os bairros que apresentaram a maior incidência de ZIKV foram Vila Moreira (6), Regissol (4) e Centro (4).

Os círculos representados pelos números 1 e 2 na Figura 10 apresentam as localidades que demonstraram maiores incidências no período analisado. Ambos os círculos apresentam raio de 765 metros, com 1,53 quilômetros de diâmetro. O círculo 1 compreende 12 pontos residenciais positivos para ZIKV, localizados nos bairros Vila Moreira (6), Loteamento Jardim São José (2), Vila Maria (1), Loteamento São Bernardo (1), Residencial Reynaldo Trovo (1) e São Pedro (1). O círculo dois apresentou oito casos positivos para ZIKV, sendo eles encontrados nos bairros Regissol (4), Portal Cidade Amiga (3) e Jardim Laguna (1). Somados, os dois círculos apresentaram 20 casos positivos, representando aproximadamente 46% de todos os casos positivos inseridos no estudo e 53% dos pontos localizados no interior do município de Mirassol por meio das coordenadas geográficas.

Figura 10. Distribuição dos pacientes positivos no município de Mirassol/SP. Regiões 1 e 2 correspondidas por um raio de 765m para bairros residenciais do município.

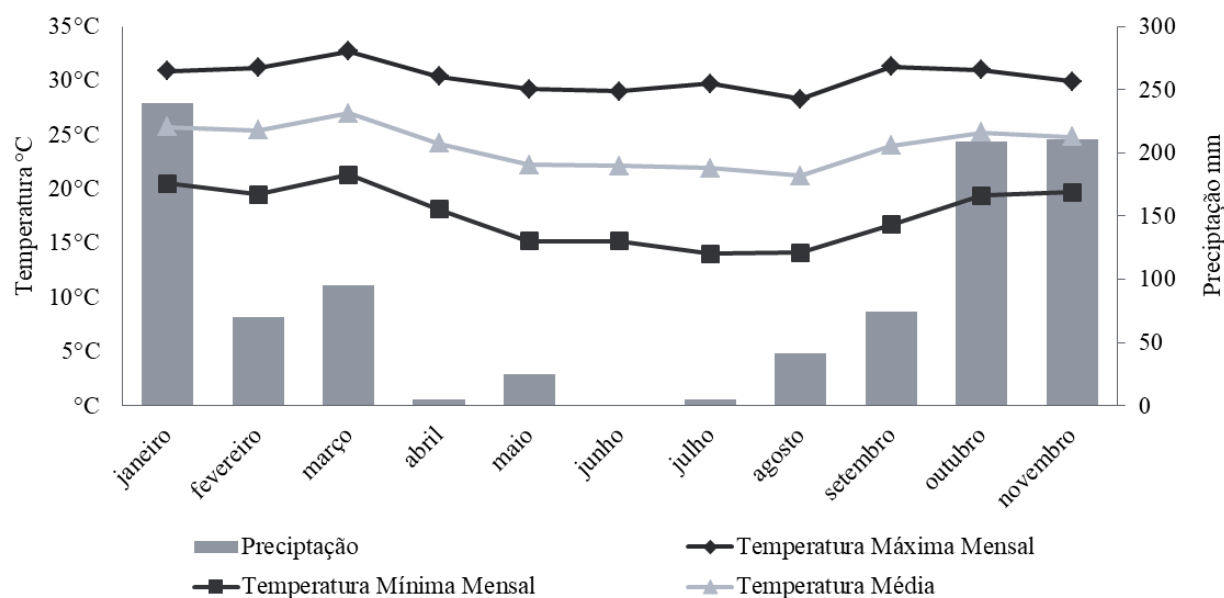


Fonte: Do autor.

4.6 Medições climáticas e pluviométricas

Dados da média de temperatura e precipitação foram medidos pelo instituto CIIAGRO. O clima da região apresenta-se como subtropical, de forma quente e úmida nas estações chuvosas e invernos secos e amenos com temperaturas oscilando, nas ocasiões mais frias, em torno de 16 °C a 18 °C (IBGE/2018). O clima nos meses de Junho a Setembro se apresenta seco, com temperaturas abaixo de 18 °C (IBGE/2018). A cidade obteve uma temperatura média anual de 23,9 °C e uma pluviosidade anual de 975,4 mm no período de Janeiro a Novembro no ano de 2018(Ciiagro, 2018) (Figura 11).

Figura 11. Índices de precipitação, temperaturas máximas, médias e mínimas do ano de 2018 do município de Mirassol/SP.



Fonte: adaptado de CIIAGRO ONLINE/2018

5. DISCUSSÃO

A expansão do ZIKV pelas Américas ressalta a importância da vigilância e monitoramento de doenças emergentes. Após sua introdução no Brasil, o vírus levantou outra problemática, os efeitos que poderiam causar em gestantes de todo o país. Relatou-se um crescimento abrupto de casos de microcefalia e hoje se sabe a estreita relação que o ZIKV possui com deformidades neurológicas (Armstrong *et al.*, 2017; Holbrook, 2017; Saiz *et al.*, 2017).

Uma diversidade de estudos reportam os diferentes e evidentes sinais clínicos da febre Zika, descrevendo os principais sintomas associados à infecção como forma de diagnóstico. No entanto, a sobreposição de sintomas com outras doenças causadas por vírus do gênero *Flavivirus*, somada as evidências de que, aproximadamente, 80% dos infectados pelo vírus não manifestam sintomas, apresenta-se como uma falha no monitoramento da real circulação do vírus pelo mundo. Outro grande problema encontrado é o de que a maioria dos estudos epidemiológicos realizados para a infecção por ZIKV focam em infecções sintomáticas (Daudens-Vaysse *et al.*, 2016). O Zika vírus desde seu descobrimento foi descrito como uma doença auto-limitante e assintomática (Daudens-Vaysse *et al.*, 2016). Diante da importância de um monitoramento mais efetivo da infecção do ZIKV em um parâmetro mundial, o atual estudo coletou amostras de urina de pacientes assintomáticos localizados em um município com histórico de diversas arboviroses. A necessidade de apresentar dados atualizados da circulação do vírus na região foi um dos critérios estabelecidos durante a idealização do projeto de estudo.

Flamand e colaboradores (2016) realizaram um estudo de monitoramento da infecção por ZIKV em 3050 gestantes, na Guiana Francesa, no primeiro semestre de 2016. Foram realizados ensaios de RT-PCR para ZIKV a partir de amostras de soro e urina coletadas. Ao final do estudo foi possível diagnosticar que 77% das mulheres grávidas infectadas por ZIKV eram assintomáticas (Flamand *et al.*, 2017). Os dados verificados por Flamand e colaboradores corroboram com os dados descritos na literatura de que 80% dos pacientes não apresentam sintomas para a infecção por ZIKV (Daudens-Vaysse *et al.*, 2016; Moreira *et al.*, 2017). Nosso estudo dividiu os pacientes em grupos de sintomáticos e sem sintomas clínicos para arboviroses a fim de averiguar a circulação do vírus em indivíduos com diferentes características clínicas. Nosso estudo apresentou dados de 447 pacientes sem sintomas clínicos para arboviroses no

período de nove meses, correspondendo a aproximadamente 76% dos pacientes inseridos no estudo. Aproximadamente 6,6% dos pacientes sem sintomas clínicos analisados apresentaram-se positivos para ZIKV, o que corresponde a 68% de todos os casos positivos. Os dados analisados até o presente momento são concordantes com a literatura que caracterizam a febre Zika caracteriza como uma doença majoritariamente assintomática (Flamand *et al.*, 2017). No entanto, é importante a ressalva de que o número de coletas no grupo de pacientes sintomáticos foi inferior ao de sem sintomas clínicos. Dessa forma, ao analisar a porcentagem de pacientes positivos para ZIKV nos diferentes grupos, verificamos que no grupo de sintomáticos, 9,9% (n=14) dos pacientes apresentaram-se positivos, contra 6,6% (n=30) dos pacientes inclusos no grupo sem sintomas clínicos. Assim, embora na avaliação final dos positivos para ambos os grupos os sem sintomas clínicos obtiveram maior quantidade de pacientes infectados, foi no grupo de sintomáticos que o vírus esteve presente em porcentagem maior de pacientes pertencentes ao grupo analisado. Porém, é importante ressaltar que a coleta realizada no grupo de pacientes sem sintomas clínicos foi restrita apenas a amostras de urina. Dessa forma, esse valor poderia ser maior se fosse coletado amostras de soro também deste grupo.

Os sintomas, quando presentes, são descritos pela presença de febre média (38,5 °C), manchas vermelhas na pele, conjutivite não purulenta (olhos vermelhos), dores musculares e dores de cabeça (Karkhah *et al.*, 2018). Em alguns casos também já foi verificado a presença de tosse, dores de garganta, enjoos e vômitos (Colombo *et al.*, 2017; Karkhah *et al.*, 2018). Esses estudos concordam com os dados apresentados, uma vez que os sintomas mais relatados pelos 14 pacientes sintomáticos positivos para ZIKV foram dores musculares, dor nos olhos e febre. Embora o grupo de pacientes sem sintomas clínicos apresentaram sintomas de forma inferior ao de sintomáticos, ainda houve pacientes que declararam a presença de sintomas no momento da coleta. Desses sintomas, dores musculares, enjoo, febre e dor nos olhos foram, também, os mais aparentes. Por outro lado, olhos vermelhos, intolerância a luz, manchas na pele, coceira e dores nas juntas foram os sintomas menos presentes. No entanto, é importante relatar que tais pacientes estavam na UPA devido a diversos motivos, que poderiam explicar a presença desses sintomas, não sendo estritamente a infecção por vírus.

Em relação ao número de coletas e casos positivos verificados pelo presente estudo, outra informação relevante extraída a respeito de sua análise relaciona-se ao número reduzido de coletas de pacientes sintomáticos a partir do mês de Junho (Figura

3.). Isso pode ser explicado devido ao início dos meses referentes à estação de inverno, período em que outras doenças apresentam uma intensificação em seu interesse epidemiológico, como doenças respiratórias que são intensificadas na exposição ao frio. No entanto, nossos dados são importantes ao destacar que mesmo nesses períodos, a circulação e a infecção pelo ZIKV foram confirmadas em pacientes que não apresentavam sintomas para arboviroses (Figura 5.). Demonstrando que campanhas contra o vetor e o controle da circulação da infecção por arboviroses não devem ser restritas apenas a meses com altas taxas de infectividade pelos vírus.

Diversos estudos comprovam que a persistência do ZIKV em amostras de urina é superior comparado com a de fluidos como o plasma e soro (Joguet *et al.*, 2017; Barzon *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018; Paz-Bailey *et al.*, 2018). Dessa forma, esperávamos que os pacientes que fossem positivos apenas em urina para ZIKV apresentassem um tempo superior do aparecimento de sintomas do que os positivos apenas em soro ou em ambos os fluidos. No entanto, até o momento não foi o encontrado por esse estudo, uma vez que alguns pacientes positivos apenas em soro relataram período de sintomas superior ao dos grupos de positivos apenas em urina. Tal fato pode ser explicado devido à presença de coinfeção por ZIKV/DENV-2 em 11 (78,6%) dos 14 pacientes sintomáticos avaliados para ambos os vírus. Atenta-se, assim, ao fato de que tais pacientes poderiam estar apresentando sintomas dos dois vírus conjuntamente, tendo em vista que todos os pacientes coinfectados apresentaram a presença de DENV-2 em amostras de soro, apontando para o período de detectável viremia representado pelo início de infecção (Neumayr *et al.*, 2017; Massad *et al.*, 2018).

A cocirculação e coinfeção de Zika, Dengue e Chikungunya já foi descrita na literatura, uma vez que mosquitos do gênero *Aedes* servem como vetores para as três doenças (Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2015; Cherabuddi *et al.*, 2016; Carrillo-Hernandez *et al.*, 2018). Recente estudo demonstrou que *Aedes aegypti* da cidade de Manaus, Brasil, apresentaram-se suscetíveis a coinfeção por ZIKV e DENV com capacidade infecciosa em ratos dos dois vírus ao mesmo tempo (Chaves *et al.*, 2018). Além disso, também mostrou que há uma transmissão preferencial do ZIKV em relação à DENV por picados de vetores mono-infectados e coinfectados em hospedeiros vertebrados (Chaves *et al.*, 2018). Nosso estudo apresentou uma prevalência alta de 8,7% de coinfeção de ZIKV/DENV-2 quando comparados com estudos similares que reportaram coinfeção por ZIKV/DENV em Pernambuco, Brasil (2,6%) (Pessoa *et al.*, 2016), Nicaraguá

(1,7%) (Waggoner *et al.*, 2016) e São José do Rio Preto, Brasil (0,9%) (Estofolete *et al.*, 2018), mas similar com estudo realizado na fronteira da Colombia e da Venezuela (6,37%) (Carrillo-Hernandez *et al.*, 2018).

Pessoa e colaboradores (2016) analisaram amostras de plasma de 77 pacientes suspeitos de infecção por DENV, tendo encontrado a presença de ZIKV em 31 pacientes (40,2%). Waggoner e colaboradores (2016) apresentaram em seu estudo análises de 346 amostras de soro de pacientes com suspeita de infecção por arboviroses, onde dentre todos os pacientes, 47 (13,6%) apresentaram-se infectados por ZIKV. Para o estudo realizado na fronteira entre a Colombia e a Venezuela, foram utilizadas amostras de soro de 157 pacientes, tendo sido encontrado 29 (18,47%) de ZIKV em todos os pacientes (Carrillo-Hernandez *et al.*, 2018). Em São José do Rio Preto/SP, cidade vizinha a Mirassol/SP, Estofolete e colaboradores (2018) obtiveram acesso aos dados de infecção por arboviroses de 1254 pacientes, onde 139 (11%) dos pacientes inseridos no estudo estavam infectados por ZIKV. Quando analisados apenas os pacientes sintomáticos, o presente estudo apresentou um quadro de 14 pacientes infectados por ZIKV, correspondendo a 9,9% dos 141 pacientes inseridos nas análises. Esse valor é similar aos verificados nos estudos de Waggoner e colaboradores (2016), Carrillo-Hernandez colaboradores (2018) e Estofolete colaboradores (2018), porém, inferior aos 40,2% visto por Pessoa e colaboradores (2016). Esse fato pode ser explicado devido ao período em que foram realizados os estudos. Pessoa e colaboradores (2016) analisaram amostras de pacientes no mês de Maio de 2015, no Nordeste do Brasil, período em que foram identificados os primeiros casos autoctones no país, o que pode representar o início da emergente circulação do ZIKV. Embora os estudos apresentados ocorressem em localidades diferentes sob eventuais condições climáticas e temporais específicas, é importante citar que o presente estudo apresenta dados mais atualizados do ano de 2018 coletados a partir do dia 26 de Fevereiro de 2018, período em que se inicia o decaimento de índices pluviométricos e da temperatura para o município de Mirassol (Figura 11) (Ciiagro, 2018). Dessa forma, é importante analisar pacientes compreendidos no período quente e de chuvas compreendidos pelos meses de Dezembro a Fevereiro para melhores comparações, uma vez que essas condições apresentam-se mais favoráveis à proliferação dos vetores.

Ademais, ressaltamos a importância das análises realizadas em amostras de urina no presente estudo. A maioria dos estudos que se preocupam em analisar dados de coinfeções por arbovírus focam suas análises apenas em amostras de sangue. Nosso

estudo avaliou a infecção por ZIKV em soro e em amostras de urina de pacientes sintomáticos para arboviroses. Foram descritos dois estudos que realizaram detecção de coinfeção por ZIKV e DENV na urina. Em um deles, foi descrito a presença dos dois vírus a partir de um paciente retornando do Haiti para os Estados Unidos no ano de 2016 (Iovine *et al.*, 2017). No segundo, similar ao apresentado por este estudo, foi investigada infecção pelos dois vírus em 163 pacientes do período de Agosto/16 – Setembro/2016 (Chia *et al.*, 2017). Nele, foram verificado cinco casos de pacientes coinfectados (3%). Dos cinco pacientes, dois foram diagnosticados para infecção por ZIKV apenas na urina, dessa forma, a não utilização da urina no mesmo estudo afetaria a taxa de coinfeção, decaindo de 3% para 1,8% dos pacientes (Chia *et al.*, 2017). A análise concomitante de soro e urina evidenciou que 9,9% dos pacientes sintomáticos apresentavam infecção por ZIKV. No entanto, se fosse priorizado as análises apenas em amostras de soro, como feito por outros estudos (Pessoa *et al.*, 2016; Waggoner *et al.*, 2016; Carrillo-Hernandez *et al.*, 2018; Estofolete *et al.*, 2018), nossa taxa de infecção por ZIKV decairia para 7,4%. Além disso, os valores de coinfeção também decairiam de 8,7% para 5,7% dos pacientes analisados, uma vez que foi observada a presença de ZIKV apenas em amostras de urina em quatro pacientes. A não utilização de outros fluidos para o diagnóstico de ZIKV pode contribuir para os altos índices de subnotificação de pacientes infectados por arboviroses. Dessa forma, nosso estudo comprova a importância da utilização de urina, além do soro, para estudos que visam avaliar a circulação do vírus.

Um estudo realizado por Cherabuddi e colaboradores (2016) analisou o caso de uma paciente coinfectada por ZIKV/DENV-2 retornando do Haiti que apresentou inchaço nas articulações das extremidades inferiores, classificado como sintomas mais aparentes em infecção por ZIKV do que por DENV. No entanto, o paciente apresentou manifestações sintomáticas mais agressivas ao final do quadro clínico do que já fora descrito na literatura por infecção de ZIKV, incluindo dores musculares mais severas. Aparentando que a coinfeção de ZIKV/DENV-2 tornou os sintomas mais aparentes (Cherabuddi *et al.*, 2016). Destaca-se, assim, importância de estudos que configurem como objetivo a averiguação de possíveis coinfeções para arbovírus. Também foi de interesse do presente estudo averiguar diferentes sintomas declarados por pacientes coinfectados por ZIKV/DENV e por monoinfectados apenas por ZIKV, no entanto, de todos os pacientes sintomáticos testados para ambos arbovírus, todos se apresentaram coinfectados, o que não permitiu que tal análise fosse realizada.

A cidade de Mirassol torna-se um sítio de interesse epidemiológico visto seu histórico de endemia por Dengue em anos prévios ao presente estudo. Embora tenha sido verificado em testes *in vivo* e *in vitro* que o aprimoramento dependente de anticorpos (ADE) pode ocorrer em pacientes com anticorpos anti-DENV que adquirirem ZIKV (Dejnirattisai *et al.*, 2016; Priyamvada *et al.*, 2016) e vice-versa (Kawiecki e Christofferson, 2016), novos estudos focados em análises de infecção sequencial DENV – ZIKV *in vivo* tem mostrado dados contrários aos observados em ensaios anteriores. Recentes estudos realizados em macacos do gênero *Rhesus* infectados por DENV e depois infectados por ZIKV demonstraram que a sequencial infecção não apresentou proteção nem aumento do título de ZIKV nesse modelo de animais não humanos (Mccracken *et al.*, 2017; Pantoja *et al.*, 2017). Estudos focados no efeito da ADE em humanos apresentaram dados também conflitantes. Estudos *in vitro* utilizando sangue de humanos mostraram que a imunidade prévia a DENV apresentou respostas imunes melhoradas contra o ZIKV, com ressalvas a uma pequena fração de indivíduos infectados pelo ZIKV que demonstrou expressar anticorpos com atividade estimulante contra o DENV-4 (Delgado *et al.*, 2018). No entanto, outro estudo mostrou que monócitos de sangue periféricos em humanos são as principais células alvo que mediam a infectividade aumentada do ZIKV na presença de soros imunes do DENV (Li *et al.*, 2018). Além disso, é importante a ressalva de que atividade medida *in vitro* não reflete necessariamente a situação *in vivo*. Recentemente, Rodriguez-Barraquer e colaboradores (2019) apresentaram dados que suportam a hipótese de que uma prévia exposição por DENV poderia estar associados à redução do risco de infecção e sintomas por ZIKV por meio da análise de 1453 residentes do município de Salvador/BA, Brasil (Rodriguez-Barraquer *et al.*, 2019). Ademais, Masel e colaboradores (2019) realizaram um levantamento bibliográfico com o objetivo de avaliar se uma exposição prévia de DENV poderia agravar resultados clínicos da infecção por ZIKV e concluíram que limitados estudos humanos indicaram um pequeno, porém não estatisticamente significativo aumento da viremia por ZIKV em hospedeiros que experienciaram DENV comparado com pacientes que não foram infectados previamente (Masel *et al.*, 2019). Dessa forma, não houve nenhuma evidência que um possível aumento na viremia do ZIKV estivesse correlacionado com uma mudança fenotípica clínica (Masel *et al.*, 2019). Assim, é crucial olhar para estudos que se preocupam em elucidar possíveis características associadas ao papel da ADE em populações endêmicas para arboviroses.

Era do nosso interesse o acompanhamento da presença e capacidade de persistência do vírus em diferentes fluídos, incluindo amostras de sêmen dos pacientes masculinos quando positivos, visto que a presença do ZIKV em sêmen mostrou-se mais persistente quando comparado com o sangue e a urina (Nicastri *et al.*, 2016). Dessa forma, realizamos a convocação dos pacientes positivos para uma segunda coleta, onde presenciamos a resistência da coleta de sêmen por parte dos pacientes masculinos, não sendo possível analisar a persistência do vírus neste fluido. No entanto, foram coletados sangue e urina, onde todos os pacientes apresentaram-se negativos. Uma das razões para tal acontecimento é o fato da segunda coleta ter sido realizada depois de três meses para esses pacientes, período superior a média verificada da persistência do vírus nos fluídos analisados. No entanto, ressaltamos a importância da realização de seriadas coletas, mesmo para pacientes negativos para o vírus, uma vez que o paciente MA205, diagnosticado como negativo para a infecção por ZIKV, apresentou-se positivo em um intervalo de apenas uma semana após a realização de uma segunda coleta.

Com a construção dos mapas georreferenciados verificou-se que a distribuição da presença de ZIKV a partir dos pacientes coletados na UPA Mirassol em três principais localidades. Sendo elas, uma no estado de Minas Gerais e duas em diferentes cidades no estado de São Paulo. No interior do município de Mirassol foi possível verificar a distribuição dos pacientes positivos para ZIKV de forma ampla na região urbana que pode ser explicado pelo efeito de ilhas de calor urbana que favorecem a expansão e a transmissão do vírus pelos vetores (Weaver e Reisen, 2010; Hubalek *et al.*, 2014). A partir dos mapas, também foi possível analisar que a UPA registrou atendimento a pacientes de diversas localidades do município, mostrando como uma importante unidade de saúde para os residentes de Mirassol.

6. CONCLUSÕES

Conclui-se que o ZIKV foi encontrado em amostras de soro de pacientes sintomáticos, assim como em amostras de urina de pacientes sintomáticos e sem sintomas clínicos para arboviroses coletadas na UPA-Mirassol. Dentre os sintomas analisados, febre, dores musculares e dores nos olhos foram os mais prevalentes. Além disso, dos pacientes avaliados para possível coinfeção, 8,7% apresentaram coinfeção por ZIKV/DENV-2. Embora a presença de sintomas específicos da infecção por ZIKV seja uma forma adotada de diagnóstico para a doença, a baixa viremia e concentração de

genoma viral nas amostras apresenta-se como um desafio para a diagnose da febre Zika. Dessa forma, destaca-se a importância de um diagnóstico específico e laboratorial mais efetivo por meio da utilização de amostras de soro e urina de pacientes para revelar casos positivos sub-notificados em pacientes. Ademais, nossos dados são importantes para articulação e desenvolvimento de campanhas de vigilância, controle de vetores e de possíveis doenças associadas com o objetivo de prever novas emergências epidemiológicas no mesmo município e em municípios vizinhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL WAHED, A. et al. Rapid Molecular Detection of Zika Virus in Acute-Phase Urine Samples Using the Recombinase Polymerase Amplification Assay. **PLoS Curr**, v. 9, Jan 25 2017. ISSN 2157-3999 (Electronic)

2157-3999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28239513> >.

ADEBANJO, T. et al. Update: Interim Guidance for the Diagnosis, Evaluation, and Management of Infants with Possible Congenital Zika Virus Infection - United States, October 2017. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 66, n. 41, p. 1089-1099, Oct 20 2017. ISSN 1545-861X (Electronic)

0149-2195 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29049277> >.

ARMSTRONG, N.; HOU, W.; TANG, Q. Biological and historical overview of Zika virus. **World J Virol**, v. 6, n. 1, p. 1-8, Feb 12 2017. ISSN 2220-3249 (Print)

2220-3249 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28239566> >.

ARSUAGA, M. et al. Probable sexual transmission of Zika virus from a vasectomised man. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 10, p. 1107, Oct 2016. ISSN 1474-4457 (Electronic)

1473-3099 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27676342> >.

ATKINSON, B. et al. Detection of Zika Virus in Semen. **Emerg Infect Dis**, v. 22, n. 5, p. 940, May 2016. ISSN 1080-6059 (Electronic)

1080-6040 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27088817> >.

BARDINA, S. V. et al. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting antinflavivirus immunity. **Science**, v. 356, n. 6334, p. 175-180, Apr 14 2017. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28360135> >.

BARRERA-CRUZ, A. et al. [Technical guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of Zika virus infection]. **Rev Med Inst Mex Seguro Soc**, v. 54, n. 2, p. 211-24, Mar-Apr 2016. ISSN 2448-5667 (Electronic)

0443-5117 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26960050> >.

BARZON, L. et al. Virus and Antibody Dynamics in Travelers With Acute Zika Virus Infection. **Clin Infect Dis**, v. 66, n. 8, p. 1173-1180, Apr 3 2018. ISSN 1537-6591 (Electronic)

1058-4838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29300893> >.

BAUD, D. et al. An update on Zika virus infection. **Lancet**, v. 390, n. 10107, p. 2099-2109, Nov 4 2017. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28647173> >.

BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro Surveill**, v. 19, n. 13, Apr 3 2014. ISSN 1560-7917 (Electronic)

1025-496X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24721538> >.

BLITVICH, B. J.; FIRTH, A. E. Insect-specific flaviviruses: a systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. **Viruses**, v. 7, n. 4, p. 1927-59, Apr 10 2015. ISSN 1999-4915 (Electronic)

1999-4915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25866904> >.

BOGOCH, II et al. Potential for Zika virus introduction and transmission in resource-limited countries in Africa and the Asia-Pacific region: a modelling study. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 11, p. 1237-1245, Nov 2016. ISSN 1474-4457 (Electronic)

1473-3099 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27593584> >.

BOLLING, B. G. et al. Insect-Specific Virus Discovery: Significance for the Arbovirus Community. **Viruses**, v. 7, n. 9, p. 4911-28, Sep 10 2015. ISSN 1999-4915 (Electronic)

1999-4915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26378568> >.

BONALDO, M. C. et al. Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 6, p. e0004816, Jun 2016. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27341420> >.

BRAGA, J. U. et al. Accuracy of Zika virus disease case definition during simultaneous Dengue and Chikungunya epidemics. **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. e0179725, 2017. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28650987> >.

BRASIL. Levantamento Rápido de Índices para Aedes Aegypti (LIRAA) para vigilância entomológica do Aedes

aegypti no Brasil : metodologia para avaliação dos índices de Breteau e Predial e tipo de recipientes. TRANSMISSÍVEIS, V. D. D. Brasília: MS – OS 2013/0147. 1: 84 p. 2013.

BUCKLEY, A.; GOULD, E. A. Detection of virus-specific antigen in the nuclei or nucleoli of cells infected with Zika or Langkat virus. **J Gen Virol**, v. 69 (Pt 8), p. 1913-20, Aug 1988. ISSN 0022-1317 (Print)

0022-1317 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2841406> >.

CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 6, p. 653-660, Jun 2016. ISSN 1474-4457 (Electronic)

1473-3099 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26897108> >.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 21, n. 10, p. 1885-6, Oct 2015. ISSN 1080-6059 (Electronic)

1080-6040 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26401719> >.

CARNEIRO, L. A.; TRAVASSOS, L. H. Autophagy and viral diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Microbes Infect**, v. 18, n. 3, p. 169-71, Mar 2016. ISSN 1769-714X (Electronic)

1286-4579 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26774331> >.

CARRILLO-HERNANDEZ, M. Y. et al. Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. **BMC Infect Dis**, v. 18, n. 1, p. 61, Jan 30 2018. ISSN 1471-2334 (Electronic)

1471-2334 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29382300> >.

CHAN, J. F. et al. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. **J Infect**, v. 72, n. 5, p. 507-24, May 2016. ISSN 1532-2742 (Electronic)

0163-4453 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26940504> >.

CHANG, C. et al. The Zika outbreak of the 21st century. **J Autoimmun**, v. 68, p. 1-13, Apr 2016. ISSN 1095-9157 (Electronic)

0896-8411 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26925496> >.

CHAVES, B. A. et al. Coinfection with Zika Virus (ZIKV) and Dengue Virus Results in Preferential ZIKV Transmission by Vector Bite to Vertebrate Host. **J Infect Dis**, v. 218, n. 4, p. 563-571, Jul 13 2018. ISSN 1537-6613 (Electronic)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29659904> >.

CHERABUDDI, K. et al. Zika and Chikungunya virus co-infection in a traveller returning from Colombia, 2016: virus isolation and genetic analysis. **JMM Case Rep**, v. 3, n. 6, p. e005072, Dec 2016. ISSN 2053-3721 (Print)

2053-3721 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28348794> >.

CHIA, P. Y. et al. Clinical features of patients with Zika and dengue virus co-infection in Singapore. **J Infect**, v. 74, n. 6, p. 611-615, Jun 2017. ISSN 1532-2742 (Electronic)

0163-4453 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28344113> >.

CIAGRO. CIAGRO ONLINE. 2018. Disponível em: < <http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/#Monitoramento> >.

CLETON, N. et al. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. **J Clin Virol**, v. 55, n. 3, p. 191-203, Nov 2012. ISSN 1873-5967 (Electronic)

1386-6532 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22840968> >.

COLOMBO, T. E. et al. Clinical, laboratory and virological data from suspected ZIKV patients in an endemic arbovirus area. **J Clin Virol**, v. 96, p. 20-25, Nov 2017. ISSN 1873-5967 (Electronic)

1386-6532 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28918127> >.

COLOMBO, T. E. et al. Viruria in Zika-infected pregnant women: implications for the newborn. **Future Medicine**, v. 13, n. 7, p. 449-451, 2018.

COLT, S. et al. Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily-fluids: A systematic review. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 4, p. e0005528, Apr 2017. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28394887> >.

CUNHA, M. S. et al. First Complete Genome Sequence of Zika Virus (Flaviviridae, Flavivirus) from an Autochthonous Transmission in Brazil. **Genome Announc**, v. 4, n. 2, Mar 3 2016. ISSN 2169-8287 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26941134> >.

DA COSTA, C. F. et al. Evidence of vertical transmission of Zika virus in field-collected eggs of *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 7, p. e0006594, Jul 2018. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30011278> >.

DAUDENS-VAYSSE, E. et al. Zika emergence in the French Territories of America and description of first confirmed cases of Zika virus infection on Martinique, November 2015 to February 2016. **Euro Surveill**, v. 21, n. 28, Jul 14 2016. ISSN 1560-7917 (Electronic)

1025-496X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27447300> >.

DE ANDRADE, G. C. et al. Arboviruses and the eye. **Int J Retina Vitreous**, v. 3, p. 4, 2017. ISSN 2056-9920 (Print)

2056-9920 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28163928> >.

DEJNIRATTISAI, W. et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. **Nat Immunol**, v. 17, n. 9, p. 1102-8, Sep 2016. ISSN 1529-2916 (Electronic)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27339099> >.

DELGADO, F. G. et al. Improved Immune Responses Against Zika Virus After Sequential Dengue and Zika Virus Infection in Humans. **Viruses**, v. 10, n. 9, Sep 7 2018. ISSN 1999-4915 (Electronic)

1999-4915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30205518> >.

DIAMOND, M. S. et al. Innate and adaptive immune responses determine protection against disseminated infection by West Nile encephalitis virus. **Viral Immunol**, v. 16, n. 3, p. 259-78, 2003. ISSN 0882-8245 (Print)

0882-8245 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14583143> >.

DIBO, M. R. et al. Identification of the best ovitrap installation sites for gravid Aedes (Stegomyia) aegypti in residences in Mirassol, state of Sao Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 339-43, Jul 2005. ISSN 0074-0276 (Print)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16113880> >.

DIBO, M. R. et al. Study of the relationship between Aedes (Stegomyia) aegypti egg and adult densities, dengue fever and climate in Mirassol, state of Sao Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 6, p. 554-60, Sep 2008. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18949325> >.

DICK, G. W.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 46, n. 5, p. 509-20, Sep 1952. ISSN 0035-9203 (Print)

0035-9203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12995440> >.

DIGOUTTE, J. P. et al. Continuous cell lines and immune ascitic fluid pools in arbovirus detection. **Res Virol**, v. 143, n. 6, p. 417-22, Nov-Dec 1992. ISSN 0923-2516 (Print)

0923-2516 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1297177> >.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Rev Saude Publica**, v. 51, p. 30, Apr 10 2017. ISSN 1518-8787 (Electronic)

0034-8910 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28423140> >.

DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N Engl J Med**, v. 360, n. 24, p. 2536-43, Jun 11 2009. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19516034> >.

DUPONT-ROUZEYROL, M. et al. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. **Emerg Infect Dis**, v. 21, n. 2, p. 381-2, Feb 2015. ISSN 1080-6059 (Electronic)

1080-6040 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25625687> >.

ESTOFOLETE, C. F. et al. Co-infection between Zika and different Dengue serotypes during DENV outbreak in Brazil. **J Infect Public Health**, Oct 6 2018. ISSN 1876-035X (Electronic)

1876-0341 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30301701> >.

FAJARDO, A.; CRISTINA, J.; MORENO, P. Emergence and Spreading Potential of Zika Virus. **Front Microbiol**, v. 7, p. 1667, 2016. ISSN 1664-302X (Print)

1664-302X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27812357> >.

FARIA, N. R. et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. **Nature**, v. 546, n. 7658, p. 406-410, Jun 15 2017. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28538727> >.

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika Virus in the Americas--Yet Another Arbovirus Threat. **N Engl J Med**, v. 374, n. 7, p. 601-4, Feb 18 2016. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26761185> >.

FAVARO, E. A. et al. Physiological state of Aedes (Stegomyia) aegypti mosquitoes captured with MosquiTRAPs in Mirassol, Sao Paulo, Brazil. **J Vector Ecol**, v. 31, n. 2, p. 285-91, Dec 2006. ISSN 1081-1710 (Print)

1081-1710 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17249346> >.

FIGUEIREDO, L. T. Emergent arboviruses in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 2, p. 224-9, Mar-Apr 2007. ISSN 0037-8682 (Print)

0037-8682 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17568894> >.

FLAMAND, C. et al. The proportion of asymptomatic infections and spectrum of disease among pregnant women infected by Zika virus: systematic monitoring in French Guiana, 2016. **Euro Surveill**, v. 22, n. 44, Nov 2017. ISSN 1560-7917 (Electronic)

1025-496X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29113627> >.

FOY, B. D. et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 5, p. 880-2, May 2011. ISSN 1080-6059 (Electronic)

1080-6040 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21529401> >.

FRANK, C. et al. Sexual transmission of Zika virus in Germany, April 2016. **Euro Surveill**, v. 21, n. 23, Jun 9 2016. ISSN 1560-7917 (Electronic)

1025-496X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27311329> >.

FREIRE, Paulo. Pedagogia do oprimido. 17. ed. Rio de Janeiro: Paz e Terra, 1987.

FREOUR, T. et al. Sexual transmission of Zika virus in an entirely asymptomatic couple returning from a Zika epidemic area, France, April 2016. **Euro Surveill**, v. 21, n. 23, Jun 9 2016. ISSN 1560-7917 (Electronic)

1025-496X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27311680> >.

GABAGLIA, C. R. Zika virus and diagnostics. **Curr Opin Pediatr**, v. 29, n. 1, p. 107-113, Feb 2017. ISSN 1531-698X (Electronic)

1040-8703 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27870689> >.

GOURINAT, A. C. et al. Detection of Zika virus in urine. **Emerg Infect Dis**, v. 21, n. 1, p. 84-6, Jan 2015. ISSN 1080-6059 (Electronic)

1080-6040 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25530324> >.

GUEDES, D. R. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerg Microbes Infect**, v. 6, n. 8, p. e69, Aug 9 2017. ISSN 2222-1751 (Electronic)

2222-1751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28790458> >.

HADDOW, A. J. et al. Twelve Isolations of Zika Virus from *Aedes (Stegomyia) Africanus* (Theobald) Taken in and above a Uganda Forest. **Bull World Health Organ**, v. 31, p. 57-69, 1964. ISSN 0042-9686 (Print)

0042-9686 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14230895> >.

HALSTEAD, S. B. The Alexander D. Langmuir Lecture. The pathogenesis of dengue. Molecular epidemiology in infectious disease. **Am J Epidemiol**, v. 114, n. 5, p. 632-48, Nov 1981. ISSN 0002-9262 (Print)

0002-9262 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6272572> >.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **J Virol**, v. 89, n. 17, p. 8880-96, Sep 2015. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26085147> >.

HASSAN, F. I. et al. Congenital Abnormalities: Consequence of Maternal Zika Virus Infection: A Narrative Review. **Infect Disord Drug Targets**, v. 17, n. 1, p. 3-13, 2017. ISSN 2212-3989 (Electronic)

1871-5265 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27758685> >.

HOLBROOK, M. R. Historical Perspectives on Flavivirus Research. **Viruses**, v. 9, n. 5, Apr 30 2017. ISSN 1999-4915 (Electronic)

1999-4915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28468299> >.

HUBALEK, Z.; RUDOLF, I.; NOWOTNY, N. Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals. **Adv Virus Res**, v. 89, p. 201-75, 2014. ISSN 1557-8399 (Electronic)

0065-3527 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24751197> >.

IOVINE, N. M. et al. Coinfection With Zika and Dengue-2 Viruses in a Traveler Returning From Haiti, 2016: Clinical Presentation and Genetic Analysis. **Clin Infect Dis**, v. 64, n. 1, p. 72-75, Jan 1 2017. ISSN 1537-6591 (Electronic)

1058-4838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27694479> >.

JOGUET, G. et al. Effect of acute Zika virus infection on sperm and virus clearance in body fluids: a prospective observational study. **Lancet Infect Dis**, v. 17, n. 11, p. 1200-1208, Nov 2017. ISSN 1474-4457 (Electronic)

1473-3099 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28838639> >.

JOHNSON, B. W.; RUSSELL, B. J.; LANCIOTTI, R. S. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 10, p. 4977-83, Oct 2005. ISSN 0095-1137 (Print)

0095-1137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16207951> >.

KARKHAH, A. et al. Zika virus: epidemiology, clinical aspects, diagnosis, and control of infection. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, Aug 30 2018. ISSN 1435-4373 (Electronic)

0934-9723 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30167886> >.

KAWIECKI, A. B.; CHRISTOFFERSON, R. C. Zika Virus-Induced Antibody Response Enhances Dengue Virus Serotype 2 Replication In Vitro. **J Infect Dis**, v. 214, n. 9, p. 1357-1360, Nov 1 2016. ISSN 1537-6613 (Electronic)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27521359> >.

KLEBER DE OLIVEIRA, W. et al. Increase in Reported Prevalence of Microcephaly in Infants Born to Women Living in Areas with Confirmed Zika Virus Transmission During the First Trimester of Pregnancy - Brazil, 2015. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 65, n. 9, p. 242-7, Mar 11 2016. ISSN 1545-861X (Electronic)

0149-2195 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26963593> >.

KUNO, G.; CHANG, G. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Arch Virol**, v. 152, n. 4, p. 687-96, 2007. ISSN 0304-8608 (Print)

0304-8608 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17195954> >.

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 8, p. 1232-9, Aug 2008. ISSN 1080-6059 (Electronic)

1080-6040 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18680646> >.

LAZEAR, H. M.; DIAMOND, M. S. Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. **J Virol**, v. 90, n. 10, p. 4864-4875, May 15 2016. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26962217> >.

LI, M. et al. Dengue immune sera enhance Zika virus infection in human peripheral blood monocytes through Fc gamma receptors. **PLoS One**, v. 13, n. 7, p. e0200478, 2018. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30044839> >.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 48, n. 2, p. 139-45, Mar 1954. ISSN 0035-9203 (Print)

0035-9203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13157159> >.

MAGNUS, M. M. et al. Risk of Zika virus transmission by blood donations in Brazil. **Hematol Transfus Cell Ther**, v. 40, n. 3, p. 250-254, Jul-Sep 2018. ISSN 2531-1387 (Electronic)

2531-1379 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30128434> >.

MASEL, J. et al. Does prior dengue virus exposure worsen clinical outcomes of Zika virus infection? A systematic review, pooled analysis and lessons learned. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 13, n. 1, p. 1-14, 2019.

MASSAD, E. et al. Estimating the probability of dengue virus introduction and secondary autochthonous cases in Europe. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 4629, Mar 15 2018. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29545610> >.

MASSAD, E. et al. On the origin and timing of Zika virus introduction in Brazil. **Epidemiol Infect**, v. 145, n. 11, p. 2303-2312, Aug 2017. ISSN 1469-4409 (Electronic)

0950-2688 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28675351> >.

MAYER, S. V.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. **Acta Trop**, v. 166, p. 155-163, Feb 2017. ISSN 1873-6254 (Electronic)

0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27876643> >.

MCCARTHY, M. Zika virus was transmitted by sexual contact in Texas, health officials report. **BMJ**, v. 352, p. i720, Feb 4 2016. ISSN 1756-1833 (Electronic)

0959-8138 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26848011> >.

MCCRACKEN, M. K. et al. Impact of prior flavivirus immunity on Zika virus infection in rhesus macaques. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 8, p. e1006487, Aug 2017. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28771605> >.

METSKY, H. C. et al. Zika virus evolution and spread in the Americas. **Nature**, v. 546, n. 7658, p. 411-415, Jun 15 2017. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28538734> >.

MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. **Cell Host Microbe**, v. 21, n. 2, p. 134-142, Feb 8 2017. ISSN 1934-6069 (Electronic)

1931-3128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28182948> >.

MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **N Engl J Med**, v. 374, n. 10, p. 951-8, Mar 10 2016. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26862926> >.

MOORE, C. A. et al. Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. **JAMA Pediatr**, v. 171, n. 3, p. 288-295, Mar 1 2017. ISSN 2168-6211 (Electronic)

2168-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27812690> >.

MOREIRA, J. et al. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. **Clin Microbiol Infect**, v. 23, n. 5, p. 296-305, May 2017. ISSN 1469-0691 (Electronic)

1198-743X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28062314> >.

MOULIN, E. et al. Simultaneous outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections: diagnosis challenge in a returning traveller with nonspecific febrile illness. **New Microbes New Infect**, v. 11, p. 6-7, May 2016. ISSN 2052-2975 (Print)

2052-2975 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27006779> >.

MURRAY, K. O. et al. Prolonged Detection of Zika Virus in Vaginal Secretions and Whole Blood. **Emerg Infect Dis**, v. 23, n. 1, p. 99-101, Jan 2017. ISSN 1080-6059 (Electronic)

1080-6040 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27748649> >.

MUSSO, D. et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Euro Surveill**, v. 19, n. 14, Apr 10 2014. ISSN 1560-7917 (Electronic)

1025-496X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24739982> >.

MUSSO, D. et al. Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerg Infect Dis**, v. 21, n. 2, p. 359-61, Feb 2015. ISSN 1080-6059 (Electronic)

1080-6040 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25625872> >.

NASCIMENTO, O. J. M.; DA SILVA, I. R. F. Guillain-Barre syndrome and Zika virus outbreaks. **Curr Opin Neurol**, v. 30, n. 5, p. 500-507, Oct 2017. ISSN 1473-6551 (Electronic)

1350-7540 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28617719> >.

NEUMAYR, A. et al. Sentinel surveillance of imported dengue via travellers to Europe 2012 to 2014: TropNet data from the DengueTools Research Initiative. **Euro Surveill**, v. 22, n. 1, Jan 5 2017. ISSN 1560-7917 (Electronic)

1025-496X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28080959> >.

NICASTRI, E. et al. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. **Euro Surveill**, v. 21, n. 32, Aug 11 2016. ISSN 1560-7917 (Electronic)

1025-496X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27541989> >.

OLIVEIRA, D. B. L. et al. Persistence and Intra-Host Genetic Evolution of Zika Virus Infection in Symptomatic Adults: A Special View in the Male Reproductive System. **Viruses**, v. 10, n. 11, Nov 7 2018. ISSN 1999-4915 (Electronic)

1999-4915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30405055> >.

OZKURT, Z.; TANRIVERDI, E. C. Global Alert: Zika Virus-an Emerging Arbovirus. **Eurasian J Med**, v. 49, n. 2, p. 142-147, Jun 2017. ISSN 1308-8734 (Print)

1308-8734 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28638259> >.

PANTOJA, P. et al. Zika virus pathogenesis in rhesus macaques is unaffected by pre-existing immunity to dengue virus. **Nat Commun**, v. 8, p. 15674, Jun 23 2017. ISSN 2041-1723 (Electronic)

2041-1723 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28643775> >.

PASSOS, S. R. L. et al. Detection of Zika Virus in April 2013 Patient Samples, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 23, n. 12, p. 2120-2121, Dec 2017. ISSN 1080-6059 (Electronic)

1080-6040 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28953451> >.

PAZ-BAILEY, G. et al. Persistence of Zika Virus in Body Fluids - Final Report. **N Engl J Med**, v. 379, n. 13, p. 1234-1243, Sep 27 2018. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28195756> >.

PERKASA, A. et al. Isolation of Zika Virus from Febrile Patient, Indonesia. **Emerg Infect Dis**, v. 22, n. 5, p. 924-5, May 2016. ISSN 1080-6059 (Electronic)

1080-6040 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27088970> >.

PESSOA, R. et al. Investigation Into an Outbreak of Dengue-like Illness in Pernambuco, Brazil, Revealed a Cocirculation of Zika, Chikungunya, and Dengue Virus Type 1. **Medicine (Baltimore)**, v. 95, n. 12, p. e3201, Mar 2016. ISSN 1536-5964 (Electronic)

0025-7974 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27015222> >.

PETERSEN, L. R.; JAMIESON, D. J.; HONEIN, M. A. Zika Virus. **N Engl J Med**, v. 375, n. 3, p. 294-5, Jul 21 2016. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27355409> >.

PRIYAMVADA, L. et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 28, p. 7852-7, Jul 12 2016. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27354515> >.

QGIS. **QGIS Development Team - QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project.** 2018.

RASMUSSEN, S. A. et al. Zika Virus and Birth Defects--Reviewing the Evidence for Causality. **N Engl J Med**, v. 374, n. 20, p. 1981-7, May 19 2016. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27074377> >.

RODRIGUEZ-BARRAQUER, I. et al. Impact of preexisting dengue immunity on Zika virus emergence in a dengue endemic region. **Science**, v. 363, n. 6427, p. 607-610, Feb 8 2019. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30733412> >.

ROZE, B. et al. Zika virus detection in urine from patients with Guillain-Barre syndrome on Martinique, January 2016. **Euro Surveill**, v. 21, n. 9, p. 30154, 2016. ISSN 1560-7917 (Electronic)

1025-496X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26967758> >.

SAIZ, J. C. et al. Zika Virus: What Have We Learnt Since the Start of the Recent Epidemic? **Front Microbiol**, v. 8, p. 1554, 2017. ISSN 1664-302X (Print)

1664-302X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28878742> >.

SEVVANA, M. et al. Refinement and Analysis of the Mature Zika Virus Cryo-EM Structure at 3.1 Å Resolution. **Structure**, v. 26, n. 9, p. 1169-1177 e3, Sep 4 2018. ISSN 1878-4186 (Electronic)

0969-2126 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29958768> >.

SHARMA, A.; LAL, S. K. Zika Virus: Transmission, Detection, Control, and Prevention. **Front Microbiol**, v. 8, p. 110, 2017. ISSN 1664-302X (Print)

1664-302X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28217114> >.

SHINOHARA, K. et al. Zika fever imported from Thailand to Japan, and diagnosed by PCR in the urines. **J Travel Med**, v. 23, n. 1, Jan 2016. ISSN 1708-8305 (Electronic)

1195-1982 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26782128> >.

SIMPSON, D. I. Zika Virus Infection in Man. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 58, p. 335-8, Jul 1964. ISSN 0035-9203 (Print)

0035-9203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14175744> >.

SINGH, R. K. et al. Zika virus - emergence, evolution, pathology, diagnosis, and control: current global scenario and future perspectives - a comprehensive review. **Vet Q**, v. 36, n. 3, p. 150-75, Sep 2016. ISSN 1875-5941 (Electronic)

0165-2176 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27158761> >.

STAPLES, J. E. et al. Interim Guidelines for the Evaluation and Testing of Infants with Possible Congenital Zika Virus Infection - United States, 2016. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 65, n. 3, p. 63-7, Jan 29 2016. ISSN 1545-861X (Electronic)

0149-2195 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26820387> >.

TERZIAN, A. C. B. et al. Long-Term Viruria in Zika Virus-Infected Pregnant Women, Brazil, 2016. **Emerg Infect Dis**, v. 23, n. 11, p. 1891-1893, Nov 2017. ISSN 1080-6059 (Electronic)

1080-6040 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29048293> >.

THANGAMANI, S. et al. Vertical Transmission of Zika Virus in Aedes aegypti Mosquitoes. **Am J Trop Med Hyg**, v. 95, n. 5, p. 1169-1173, Nov 2 2016. ISSN 1476-1645 (Electronic)

0002-9637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27573623> >.

VILLA, R. Zika, or the burden of uncertainty. **Clin Ter**, v. 167, n. 1, p. 7-9, 2016. ISSN 1972-6007 (Electronic)

0009-9074 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26980631> >.

WAGGONER, J. J. et al. Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus. **Clin Infect Dis**, v. 63, n. 12, p. 1584-1590, Dec 15 2016. ISSN 1537-6591 (Electronic)

1058-4838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27578819> >.

WAY, J. H.; BOWEN, E. T.; PLATT, G. S. Comparative studies of some African arboviruses in cell culture and in mice. **J Gen Virol**, v. 30, n. 1, p. 123-30, Jan 1976. ISSN 0022-1317 (Print)

0022-1317 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1245842> >.

WEAVER, S. C. et al. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. **Annu Rev Med**, v. 69, p. 395-408, Jan 29 2018. ISSN 1545-326X (Electronic)

0066-4219 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28846489> >.

WEAVER, S. C. et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. **Antiviral Res**, v. 130, p. 69-80, Jun 2016. ISSN 1872-9096 (Electronic)

0166-3542 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26996139> >.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Res**, v. 85, n. 2, p. 328-45, Feb 2010. ISSN 1872-9096 (Electronic)

0166-3542 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19857523> >.

WEINBREN, M. P.; WILLIAMS, M. C. Zika virus: further isolations in the Zika area, and some studies on the strains isolated. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 52, n. 3, p. 263-8, May 1958. ISSN 0035-9203 (Print)

0035-9203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13556872> >.

WHITE, M. K. et al. Zika virus: An emergent neuropathological agent. **Ann Neurol**, v. 80, n. 4, p. 479-89, Oct 2016. ISSN 1531-8249 (Electronic)

0364-5134 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27464346> >.

WIKAN, N.; SMITH, D. R. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 7, p. e119-e126, Jul 2016. ISSN 1474-4457 (Electronic)

1473-3099 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27282424> >.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-72, Jun 2015. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26061233> >.

ZHANG, F. C. et al. Excretion of infectious Zika virus in urine. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 6, p. 641-642, Jun 2016. ISSN 1474-4457 (Electronic)

1473-3099 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27184420> >.

ZHU, Z. et al. Comparative genomic analysis of pre-epidemic and epidemic Zika virus strains for virological factors potentially associated with the rapidly expanding epidemic. **Emerg Microbes Infect**, v. 5, p. e22, Mar 16 2016. ISSN 2222-1751 (Electronic)

2222-1751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26980239> >.

ZIMMERMAN, M. G. et al. Cross-Reactive Dengue Virus Antibodies Augment Zika Virus Infection of Human Placental Macrophages. **Cell Host Microbe**, v. 24, n. 5, p. 731-742 e6, Nov 14 2018. ISSN 1934-6069 (Electronic)

1931-3128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30439342> >.

ANEXOS

ANEXO A. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apresentado aos pacientes no momento da coleta.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 466/2012/Resolução 510/2016)

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa “**Análise da presença de Arbovírus em pacientes sintomáticos e assintomáticos**” sob responsabilidade do pesquisador Lucas Rodrigues de Carvalho. O estudo será realizado com amostras de urina, sêmen e sangue total coletadas em procedimentos de rotina clínica de pacientes voluntários do sexo masculino e feminino da Uroclínica Dr. Germano em Mirassol/SP, na Unidade de Pronto Atendimento (UPA) em Mirassol/SP e no Laboratório de Estudos Genômicos em São José do Rio Preto/SP com o objetivo de investigar a presença de arbovírus, com enfoque nas doenças com alto interesse epidemiológico (Zika, Dengue, Chikungunya e Febre Amarela) e ampliar o conhecimento sobre a forma de infecção e permanência desses vírus em urina, sêmen e sangue humano. A sua participação na pesquisa poderá apresentar riscos como constrangimento nas abordagens no momento da coleta, danos físicos e/ou emocional já que envolve a coleta de sangue. Entretanto, medidas serão tomadas para minimizar o máximo possível os riscos para a saúde física e/ou emocional, como o uso de material estéril (seringas e agulhas estéreis e descartáveis), profissional qualificado para a coleta e codificação do paciente no momento da entrada no estudo. Para interpretação dos resultados, os dados dos prontuários médicos serão consultados, e a sua assinatura também autoriza consulta ao seu prontuário médico. Você poderá consultar o pesquisador responsável em qualquer época, pessoalmente ou pelo telefone da instituição, para esclarecimento de qualquer dúvida. Você está livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa. Todas as informações por você fornecidas e os resultados obtidos serão mantidos em sigilo, e estes últimos só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas. Você será informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato de estes poderem mudar seu consentimento em participar da pesquisa. Você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Este estudo é importante porque seus resultados fornecerão informações para desenvolvimento de pesquisas que analisarão a capacidade de infecção e replicação de arbovírus em fluídos corporais de pacientes sintomáticos e assintomáticos.

Diante das explicações, se você concorda em participar deste projeto, forneça os dados solicitados e coloque sua assinatura a seguir.

Nome: _____ R.G. _____

Endereço: _____ Fone: _____

_____, _____ de _____ de 20__

Assinatura do Participante

Assinatura do Pesquisador(a) responsável

OBS.: Termo apresenta duas vias, uma destinada ao participante e a outra ao pesquisador.

Nome Pesquisador(a): Lucas Rodrigues de Carvalho	Cargo/Função: Mestrando
Instituição: Laboratório de Estudos Genômicos – IBILCE/UNESP	
Endereço: Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth. CEP: 15054-210	
Telefone: (17) 98185-5894	
Projeto submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do IBILCE/UNESP	
Rua Cristóvão Colombo, 2265. Bairro: Jardim Nazareth. CEP: 15054-000	
São José do Rio Preto/SP – Fone (17) 3221.2200 (ramal 2776) e (17) 3221.2379	

ANEXO B. Questionário de sintomas apresentado aos pacientes no momento da coleta.

QUESTIONÁRIO

Data da coleta: |_|_|/|_|_|/|_|_|_|_|

Dados do paciente:

1.Nome: _____

2.Endereço Residencial

Rua/Avenida: _____ Número: _____

Bairro: _____ Município: _____

Estado: ___ Telefones:() _____/() _____/() _____

CEP: _____ Zona: () urbana () rural

Sintomas apresentados

Sintomas	Duração (dias)
Febre	_____
Enjoo	_____
Vômito	_____
Olhos vermelhos	_____
Dor nos olhos	_____
Intolerância a luz	_____
Coceira	_____
Manchas na pele	_____
Dores musculares	_____
Dores nas juntas	_____