UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MARILIA FARIGNOLI ROMEIRO

**Estudo sobre infecções por *Alphavirus* e *Flavivirus* em
amostras de banco de sangue**

Ribeirão Preto, SP

2019

MARILIA FARIGNOLI ROMEIRO

**Estudo sobre infecções por *Alphavirus* e *Flavivirus* em
amostras de banco de sangue**

Tese de Doutorado a ser apresentada ao curso de
Pós-Graduação em Clínica Médica – Investigação
Biomédica da Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto – Universidade de São Paulo, para a obtenção
do título de Doutor(a) em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

Ribeirão Preto, SP

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO DE PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Romeiro, Marília Farignoli

Estudo sobre infecções por *Alphavirus* e *Flavivirus* em amostras de banco de sangue / Marília Farignoli Romeiro; orientador: Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo - Ribeirão Preto, 2019.

75p.: il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica – Investigação Biomédica, 2019.

1.*Flavivirus* 2.*Alphavirus* 3.RT-PCR em tempo real 4.Banco de sangue

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Marilia Farignoli Romeiro

Título: estudo sobre infecções por *Alphavirus* e *Flavivirus* em amostras de banco de sangue

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica – Investigação Biomédica.

Banca Examinadora

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu esposo Marcos e aos meus pais, Maria Helena e Marins, pelo amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por seu amor e força, sempre me abençoando e capacitando para tudo que Ele me destina.

Ao professor Tadeu pela oportunidade, ensinamento e confiança.

A Ana Beatriz, Marília, Cesar e demais funcionários do banco de sangue da Santa Casa de São Carlos, por terem contribuído assiduamente para a realização deste trabalho.

Aos amigos Marcilio, William e Felipe que não mediram esforços para que esse projeto se realizasse.

Aos amigos Aline, Danilo, Angélica, Leonardo e aos demais colegas de laboratório, pela amizade, pelo carinho e pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos.

Aos funcionários Soraya, Sueli, Maria Lúcia, Danillo, Leila e Adriana por toda presteza e dedicação ao Centro de Pesquisa em Virologia e seus alunos.

Aos Professores e colegas do Centro de Pesquisa em Virologia, pois cada um de sua maneira e com seu carinho me acolheram e contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa e o financiamento deste estudo.

“Não existem sonhos impossíveis para aqueles que realmente acreditam que o poder realizador reside no interior de cada ser humano, sempre que alguém descobre esse poder algo antes considerado impossível se torna realidade”.

ALBERT EINSTEIN

ROMEIRO, M.F. **Estudo sobre infecções por Alphavirus e Flavivirus em amostras de doadores de sangue.** 2019-75f. Tese (Mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

RESUMO

Os primeiros bancos de sangue no Brasil foram fundados em 1941. Com a descoberta do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e principalmente a partir de 1988, os doadores passaram a ser cadastrados e o sangue triado para alguns patógenos. Contudo, arbovírus como os do Dengue, já descrito em casos de transmissão via transfusional, não são triados em doadores, e com a emergência dos vírus Zika e Chikungunya este risco se tornou ainda maior. O presente trabalho, realizado em 2017 e 2018, estuda infecções por *Alphavirus* e *Flavivirus* em doadores de sangue na cidade de São Carlos, SP. Foram analisados plasmas de 5.608 doadores de sangue por pesquisa dos genomas destes vírus e de anticorpos, bem como testes de neutralização. Observou-se que 4 doadores estavam infectados com vírus Zika representando risco de transmissão viral a receptores de produtos dos seus sangues. Oito doadores apresentavam anticorpos IgM específicos para CHIKV, mostrando que, em período anterior recente, no qual ocorreram alguns casos na comunidade, doadores teriam oferecido risco de transmissão a receptores de produtos dos seus sangues. A ocorrência de 36 doadores IgM-positivos para vírus Mayaro e ainda outros 11 com anticorpos neutralizantes específicos, sugere que, em período anterior recente, estes indivíduos tenham se infectado por este vírus com risco de transmissão a receptores de produtos dos seus sangues. O inédito diagnóstico sorológico de infecções por Mayaro em doadores de sangue evidencia que este vírus deva ter circulado, ou estar circulando, inadvertido, no Estado de São Paulo, a causar infecção humana, o que exige a atenção do Sistema de Saúde Pública.

Palavras Chaves: Banco de sangue, arbovírus, RT-PCR em tempo real, *Alphavirus* e *Flavivirus*.

ROMEIRO, M.F. **A study on alphavirus and flavivirus infections in blood bank samples.** 2019-75f. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

ABSTRACT

The first blood banks in Brazil were founded in 1941. With the discovery of the Human Immunodeficiency Virus (HIV) and especially since 1988, donors have been registered and blood treated for some pathogens. However, arboviruses such as Dengue fever, already described in cases of transfusional transmission, are not checked for in donors, and with the emergence of Zika and Chikungunya viruses this risk has become even greater. The present work, carried out in 2017 and 2018, studies infections with *Alphavirus* e *Flavivirus* in blood donors in the city of São Carlos, SP. Plasmas of 5,608 blood donors were analyzed for the genomes of these viruses and antibodies, as well as neutralization tests. 4 donors were found to be infected with Zika virus representing a risk of viral transmission to recipients of their blood products. Eight donors had CHIKV-specific IgM antibodies showing that in a recent previous period, in which some cases occurred in the community, donors would have offered a risk of transmission to recipients of their blood products. The occurrence of 36 IgM-positive donors for Mayaro virus and 11 others with specific neutralizing antibodies suggests that in a recent past, these individuals have become infected with this virus at risk of transmission to recipients of their blood products. The unprecedented serological diagnosis of infections by Mayaro in blood donors shows that this virus must have circulated, or must be circulating, inadvertently, in the state of São Paulo, causing human infection, which requires the attention of the Public Health System.

Keywords: Blood Bank, arbovirus, RT-PCR in real time, *Alphavirus* and *Flavivirus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do ciclo zoonótico dos Arbovírus	18
Figura 2. Representação genômica dos <i>Alphavirus</i> e sua tradução.	19
Figura 3. Representação estrutural dos <i>Flavivirus</i>	22
Figura 4. Imunofluorescência indireta e efeito citopático em células C6/36 para o vírus Zika.....	38
Figura 5. Ensaio de placa para a titulação do vírus Zika	39
Figura 6. Perfil dos controles positivos MAYV e CHIKV	40
Figura 7. Perfil do controle positivo de <i>Flavivirus</i>	41
Figura 8. Perfil do controle positivo do vírus Zika	42
Figura 9. Árvore filogenética (nucleotídeos) do ZIKV para a região parcial da NS5 gerada por meio do método de Máxima Parcimônia	44
Figura 10. Incidência das amostras IgM positivas para ZIKV, MAYV, CHIKV ao longo do período de coleta	46
Figura 11. Gráfico da incidência das amostras IgG positivas para ZIKV, MAYV, CHIKV	47
Figura 12. Dados de soroprevalência após soroneutralização das amostras IgG positivas para ZIKV, MAYV, CHIKV	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Flavivirus</i> e <i>Alphavirus</i> utilizados neste estudo.	31
Tabela 2. <i>Primers</i> para a RT-PCR do gênero <i>Alphavirus</i>	33
Tabela 3. <i>Primers</i> PF1S e PF2Rbis utilizados na RT-PCR de <i>Flavivirus</i>	33
Tabela 4. <i>Primers</i> ZIKV 1086 e ZIKV 1162c específicos para o vírus Zika.	34
Tabela 5. Título viral por UFP/mL e tempo de incubação em dias	37
Tabela 6. Dados das amostras RT-PCR ZIKV positivas	43

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

cDNA – DNA complementar
CHIKV – Vírus Chikungunya
CMC – Carboximetilcelulose
CPV – Centro de Pesquisa em Virologia
DC – Célula Dendrítica
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
DENV-1 – Vírus do Dengue sorotipo 1
DENV-2 – Vírus do Dengue sorotipo 2
DENV-3 – Vírus do Dengue sorotipo 3
DENV-4 – Vírus do Dengue sorotipo 4
E1 – Proteína estrutural 1
E1, E2, E3 – Proteínas Estruturais 1, 2 e 3
EEEV- Vírus da Encefalite Equina do Leste
ELISA – *Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay* (Ensaio Imunoenzimático)
FAPESP- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FITC – Isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*)
FMRP- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
IFI- Imunofluorescência Indireta
IgG- Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
JEC – Complexo da Encefalite Japonesa
JEV – Vírus da Encefalite Japonesa
MAYV – Vírus Mayaro
MEM – Meio mínimo essencial
MUCV – Vírus Mucambo
NS1 – Proteína não estrutural 1
NS1, 2a, 2b, 3, 4a, 4b e 5 – Proteínas não estruturais 1, 2a, 2b, 3, 4a, 4b e 5
NsP1 – Proteína não estrutural 1
NsP1, 2 e 3 – Proteínas ou genes não estruturais 1,2 e 3
PBS – Tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline*)
PCR – Reação em cadeia da Polimerase

RNA – Ácido Ribonucleico

ROCV – Vírus Rocio

RT-PCR – Reação em cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa

RT- Transcrição Reversa

SP- Estado de São Paulo

SLEV – Vírus da Encefalite de Saint Louis

SFB – Soro Fetal Bovino

SNC – Sistema Nervoso Central

USP – Universidade de São Paulo

VEEV – Vírus da Encefalite Equina Venezuelana

YFV 17D – Vírus da Febre Amarela cepa17D

WEEV – Vírus da Encefalite Equina do Oeste

WNV – Vírus Oeste do Nilo

ZIKV – Vírus Zika

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 EVOLUÇÃO DA TRANSFUSÃO SANGUÍNEA	16
1.2 ARBOVIROSES	17
1.3 GÊNERO ALPHAVIRUS	19
1.4 GÊNERO FLAVIVIRUS	22
1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NOS INFECTADOS POR ALPHAVIRUS E FLAVIVIRUS	24
1.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DOS ALPHAVIRUS E <i>FLAVIVIRUS</i>	26
1.7. JUSTIFICATIVA	27
2. OBJETIVO	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. AMOSTRAS	30
3.1.1 Amostras de doadores de sangue	30
3.1.2 Preparação dos lotes das amostras de doadores de sangue	30
3.2 ESTOQUES VIRAIS	30
3.2.1. Preparação de estoques virais em células C6/36	30
3.2.2. Imunofluorescência Indireta	31
3.2.3. Titulação dos Estoques Virais	32
3.3 RT-PCR EM TEMPO REAL	32
3.3.1. Extração do RNA e Síntese do DNA complementar	32
3.3.2. RT-PCR para o gênero <i>Alphavirus</i>	32
3.3.3. RT-PCR em tempo real para o gênero <i>Flavivirus</i>	33
3.3.4. RT-PCR em tempo real para vírus Zika	33
3.3.5. Sequenciamento nucleotídico	34
3.4. ELISA	34
3.4.1. Detecção de anticorpos IgM e IgG para vírus Mayaro e Chikungunya	34
3.4.2. Detecção de anticorpos IgM e IgG para o vírus Zika	35
3.4.3. Teste de neutralização por redução de plaques de lise	35
4 RESULTADOS	37
4.1. PREPARAÇÃO DOS ESTOQUES VIRAIS	37
4.2. RT-PCR EM TEMPO REAL	39
4.2.1. RT-PCR em tempo real para os gêneros <i>Alphavirus</i> e <i>Flavivirus</i>	39
4.2.2 RT-PCR em tempo real específica para o vírus Zika	42
4.2.3. Sequenciamento nucleotídico	43

4.3. DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM E IgG PARA MAYV, CHIKV E ZIKV	45
4.3.1. Teste de Neutralização das amostras IgG positivas	47
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO	57
7 REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

1.1. EVOLUÇÃO DA TRANSFUSÃO SANGUÍNEA

A transfusão sanguínea é um procedimento que consiste na transferência de hemoderivados e hemocomponentes de um doador para o sistema circulatório de um receptor. Não podemos falar sobre hemoterapia sem citar o médico inglês William Harvey, que no ano de 1616 fez a primeira descrição do sistema circulatório, a partir da observação do coração de animais vivos. Nestes experimentos ele pôde observar que o coração funcionava como uma bomba transportando o sangue para as partes do corpo através das artérias e veias (WATKINS, 2001).

Os primeiros relatos de transfusões sanguíneas foram datados em 1667, na França, onde o médico, filósofo e matemático Jean Baptiste Denis realizou a primeira transfusão de sangue heteróloga, na qual transfundiu sangue de um cordeiro para um humano (HUTCHIN, 1968). Entretanto, foi somente no ano de 1818 que James Blundel realizou a primeira transfusão de sangue homologa, transfundindo sangue de homens em mulheres com hemorragia pós-parto (JUNQUEIRA, 2005).

Após estes eventos as técnicas de hemoterapia foram se aprimorando cada dia mais, e no ano de 1930, Karl Landsteiner descreveu os tipos sanguíneos do Sistema ABO. A grande descoberta dos tipos sanguíneos alavancou o sistema de hemoterapia, e foi quando, em 1936 Frederic Durán, na Espanha, fundou o primeiro banco de sangue, onde implementou técnicas de esterilização dos materiais de coleta, ficando assim conhecido como o “Pai da Transfusão Moderna” (SCHUWARZ, 2003; WATKINS, 2001).

No Brasil, as primeiras transfusões ocorreram a partir dos anos 1900, contudo, os primeiros bancos de sangue surgiram apenas nos anos de 1941 e 1942, em Porto Alegre e no Rio de Janeiro, respectivamente. Nos bancos de sangue brasileiros, a doação sanguínea era remunerada, o que atraía multidões aos bancos de sangue. A remuneração da doação, prejudicou muito o serviço de hemoterapia, pois o dinheiro atraía doadores anêmicos, alcoólatras, moradores de rua, que na maioria das vezes não possuíam um sangue saudável para ser transfundido (JUNQUEIRA et al, 2005; KENNEDY et al, 2006).

Todavia, o panorama do serviço de hemoterapia no Brasil foi transformado radicalmente na década de 80, devido a descoberta do *Human Immunodeficiency Virus (HIV)*. O altíssimo número de contaminações de pessoas transfundidas pelo HIV causou alarde em toda população. E foi neste momento que se iniciou uma luta pela doação segura, a “Brigada Helfil pela saúde”, liderada pelo cartunista Henfil, hemofílico e poli transfundido, que foi contaminado pelo vírus HIV. Tal brigada teve sua vitória marcada pela Constituição de 1988, no artigo 199, que declara terminantemente proibida toda e qualquer forma de comercialização do sangue e seus derivados (BRASIL, 2013; SARAIVA, 2005; GUERRA, 2005).

Com isso, levando em consideração o risco de transmissão de doenças via transfusão de sangue, foi estabelecido na Constituição de 1988 o decreto nº 95.721/1988, que regulamenta a Lei nº 7.649/1988, onde se estabelece a obrigatoriedade do cadastramento dos doadores de sangue, bem como a realização de exames laboratoriais no sangue coletado, visando a prevenção da propagação de doenças via transfusional. Atualmente, a Portaria 158/2016, Art. 130 afirma que é obrigatória a realização de exames laboratoriais de alta sensibilidade a cada doação, para detecção de marcadores das seguintes infecções transmissíveis pelo sangue: Sífilis, Doença de Chagas, Hepatites B e C, HIV tipos I e II e HTLV tipos I e II (BRASIL, 2013; GUERRA, 2005; SARAIVA, 2005).

Contudo existem outras doenças que podem ser transmitidas via transfusão de sangue que não passam pelo processo de exames laboratoriais de alta sensibilidade nos bancos de sangue, como as arboviroses causadas pelos vírus Dengue, Zika, Chikungunya, dentre outros (CUNHA et al. 2016; BARJAS-CASTRO et al. 2016; GALLEL et al. 2017; SHARMA et al. 2018).

1.2 ARBOVIROSES

Os arbovírus (arthropod-borne-virus) são formados por Ácido Ribonucleico (RNA) de polaridade positiva, negativa ou ambisense. Seu genoma pode ser segmentado ou não, e ter uma ou duas fitas. Estes vírus se distribuem em dez famílias: *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Asfaviridae*, *Arenaviridae*, *Nairoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Peribunyaviridae*, *Phenuiviridae*, *Rhabdoviridae* e *Reoviridae* (CHRISTOU, 2011; HUBALEK, 2012; ICTV, 2019; BLANCOU et al, 2005; JONES et al, 2008; MESLIN, 1997).

Sua manutenção na natureza ocorre em ciclos silvestres onde diversas espécies de insetos hematófagos são vetores, e os vertebrados são hospedeiros. Os arbovírus, acidentalmente, podem infectar o homem e também, animais domésticos que habitam, ou visitam, locais próximos às áreas silvestres onde estas zoonoses ocorrem, como ilustrado na figura 1 (BLANCOU et al., 2005; HUBALEK, 2012).

Países tropicais como o Brasil possuem condições ideais para a manutenção, emergência e/ou reemergência dos arbovírus. A diversidade de fauna e flora, e também a degradação ambiental contribuem para a aproximação de vetores no meio urbano que disseminam as arboviroses (FIGUEIREDO, 2000; ROMANO-LIEBER, 2000; VASCONCELOS et al, 1998). Mosquitos do gênero *Culex* e *Aedes* atuam como vetores e comumente são encontrados em ambientes urbanos, transmitindo doenças como a Dengue e a Febre Amarela (FIGUEIREDO, 2007).

No Brasil, são conhecidos 36 arbovírus causadores de doença humana e alguns deles estão associados a epidemias em áreas urbanas. Dentre as principais doenças por arbovírus no Brasil citamos a febre do Dengue, a febre do Oropouche, a encefalite de Saint Louis, a Febre Amarela, a febre do Mayaro, febre do Chikungunya e a febre do Zika. (FIGUEIREDO, 2000;2007, NETTO, 2017; MASCHERETTI, 2013; CAMPOS, 2015; AZEVEDO, 2015). Contudo, arbovírus emergentes, como o West Nile, têm risco iminente de produzir grandes epidemias no Brasil.

Figura 1. Esquema do ciclo zoonótico dos Arbovírus. Mostra, também, a transmissão viral a hospedeiros acidentais (humanos e equinos) por mosquitos vetores.

Fonte: GO et al, (2014)

São conhecidas 29 espécies de *Alphavirus* distribuídos em 8 grupos filogenéticos descritos originalmente como complexos antigênicos: Encefalite Equina Leste, Encefalite Equina Oeste, Encefalite Equina Venezuelana, Semliki Forest, Barmah Forrest, Trocara, Middelburg e Ndumu (LEUNG, 2011; FAUQUET et al, 2005).

Os vírus das Encefalites Equinas do Leste, do Oeste e a Venezuelana (*Eastern Equine Encephalitis-EEEV*; *Western Equine Encephalitis-WEEV*; *Venezuelan Equine Encephalitis-VEEV*), causam doença febril aguda, humana e equina, que pode evoluir com encefalite e levar ao óbito. (GRIFFIN, 2007; STRAUSS, 1994).

Os *Alphavirus* têm causado surtos em diversos países das Américas, como Colômbia, Venezuela, México e Estados Unidos. Nestes locais, epidemias de VEEV causaram graves problemas de saúde humana e veterinária, acarretando grande perda econômica (OSORIO, 1997). No Brasil, acredita-se que os ciclos naturais de EEEV, WEEV e VEEV devam envolver roedores silvestres, morcegos, aves e marsupiais (OSORIO, 1997; VASCONCELOS et al, 1991).

Os vírus Mucambo (MUCV) e VEEV (subtipo 1, variedade F) ocorrem nas regiões amazônica e da floresta atlântica. Eles são também causadores de casos esporádicos de doença humana febril aguda, aparentemente sem encefalite, em moradores destas regiões. Inquéritos sorológicos têm mostrado altas positivities para MUCV e VEEV 1F (IVERSSON et al, 1990; VASCONCELOS et al, 1991).

MAYV e CHIKV pertencem ao complexo antigênico *Semliki Forest*. A febre do Mayaro é uma doença aguda que causa artralgia e exantema. O MAYV é mantido na natureza como uma zoonose de primatas transmitida por mosquitos *Haemagogus*, principalmente na região amazônica (HALSEY et al., 2013). A prevalência de anticorpos para MAYV é alta no norte do estado do Amazonas, sendo que mais de 40% da população ribeirinha do Rio Negro foi infectada por este vírus (ABAD-FRANCH et al, 2012). Diversos surtos de febre do Mayaro têm sido descritos na Amazônia, inclusive em cidades como Manaus, que nos anos de 2007 e 2008, teve 33 casos de febre do Mayaro diagnosticados (MOURÃO et al, 2012). Em fevereiro de 2008, 36 casos foram descritos em Santa Bárbara, no estado do Pará (AZEVEDO et al, 2009). Entre 2010 a 2013, um surto por MAYV com 16 pacientes foi notificado na Amazônia Peruana (HALSEY et al, 2013). Além disso, têm sido descritos viajantes com febre do Mayaro

que chegam a diversos países europeus após visita à Amazônia (HASSING et al, 2010; NEUMAYR et al, 2012; RECEVEUR et al, 2010).

Outro importante *Alphavirus* que emergiu nas Américas é o CHIKV. Descoberto em 1953, na Tanzânia, este vírus causa doença febril aguda com acometimento articular e tem sido descrito na Ásia, África e agora, também, no continente Americano (GRIFFIN, 2007). Nas ilhas do Caribe, Guiana Francesa, Guiana, Venezuela e Colômbia, muitos casos de doença por CHIKV têm sido descritos nos últimos anos (INTERNATIONAL-SOCIETY-FOR-INFECTIOUS-DISEASES, 2014; OMARJEE et al, 2014). Em Porto Rico, notificou-se uma epidemia da febre do Chikungunya com rápida propagação, onde foram confirmados 206 casos (OMARJEE et al, 2014).

No Brasil, até fevereiro de 2019, foram notificados 4.149 casos de doença pelo vírus Chikungunya. Destes, 789 ocorreram na região Norte, 446 na região Nordeste, 2.730 na região Sudeste, 94 na região Sul e 90 na região Centro-Oeste (MINISTÉRIO-DA-SAÚDE, 2018). Considerando a alta infestação urbana por mosquitos *Aedes*, o que aumenta a capacidade de disseminação do vírus CHIKV, se faz necessário redobrar a atenção para que o CHIKV não produza grandes epidemias anuais, tais quais aquelas por vírus Dengue (AZEVEDO, 2015; FIGUEIREDO, 2000).

MAYV e CHIKV, durante a fase aguda da doença, provocam artrite, que, em alguns casos, pode perdurar por meses ou anos. Sabe-se que estes vírus conseguem escapar da neutralização pelos anticorpos do hospedeiro escondendo-se em vesículas apoptóticas, e assim, mantêm a infecção em macrófagos, por rondas contínuas de infecção seguidas de apoptose e fagocitose (SUHRBIER et al, 2012).

Os *Alphavirus* podem ser transmitidos por via transfusional, como descrito na ilha da Martinica em 2014, onde 4 de 2.149 plasmas tiveram o genoma de CHIKV identificado por RT-PCR (GALLIAN et al, 2014). Entretanto, no Brasil, até o momento nenhum *Alphavirus* foi detectado em produtos do sangue, visto que não há triagem para arbovírus nos bancos de sangue brasileiros.

Sabendo sobre a epidemiologia destes vírus no Brasil, e que *Alphavirus* produzem alta viremia, a exemplo do vírus CHIKV, com 10^8 cópias de RNA e ainda, que existem diferentes formas de manifestação da doença, inclusive a forma assintomática, faz-se necessário um rigoroso controle das amostras de banco de sangue, para evitar transmissão transfusional (DUTTA et al, 2014).

1.4 GÊNERO FLAVIVIRUS

Os *Flavivirus* são um gênero na família *Flaviviridae* e são arbovírus na sua maioria. Possuem estruturas físico-químicas semelhantes às dos *Alphavirus*, porém os *virions* são menores. A estrutura dos *Flavivirus* é esférica, de simetria icosaédrica e com projeções em superfície. A partícula viral é circundada por envelope lipoprotéico (oriundo da célula hospedeira) e mede entre 40 e 60 nm de diâmetro. O genoma viral é constituído por RNA de fita simples com polaridade positiva, possuindo aproximadamente 11.000 nucleotídeos. O genoma viral codifica uma única poliproteína, que é clivada por proteases virais e do hospedeiro, dando origem a três proteínas estruturais (do core-C, prM/M e E) e a sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5), ilustradas na Figura 3 (BALEOTTI et al, 2003; FIGUEIREDO, 2000; GLUBER, 2007; LINDENBACH, 2007, RICE, 2007).

Figura 3. Representação estrutural dos Flavivirus. O *virion* maduro possui nucleocapsídeo icosaédrico, e as glicoproteínas E e M compõem seu envelope. O genoma (de 11.000 nucleotídeos) forma uma única poliproteína, que quando clivada por proteases, gera três proteínas estruturais (C, prM/M e E) e sete não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5).

Fonte: Adaptado pela autora, site [www.https://viralzone.expasy.org](https://viralzone.expasy.org). (2019)

Estudos filogenéticos mostram *Flavivirus* em diferentes grupos já previamente conhecidos como complexos antigênicos. Estes incluem o do Dengue (DENV), o da Febre Amarela (YFV), o da Encefalite Transmitida por Carrapatos (TBEC) e o da Encefalite Japonesa (JEC). Dentre os *Flavivirus*, 73 são capazes de infectar seres humanos e produzir doença febril aguda, febre hemorrágica, meningoencefalite e/ou hepatite (CHAVEZ et al, 2010).

O vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV), pertencente ao JEC, é amplamente distribuído nas Américas, do Canadá à Argentina (CHAVEZ et al, 2010). No Brasil, estudos soropidemiológicos mostraram anticorpos reagentes em seres humanos, e também o SLEV foi isolado em cérebro de cavalos (ROCCO et al, 2005; ROSA et al, 2013). Em 2006, na cidade de São José do Rio Preto- SP, durante epidemia de Dengue, o SLEV foi detectado em seis pacientes que apresentavam sintomatologia confundida com febre do Dengue, e dois destes casos evoluíram para meningite (MONDINI et al, 2007; TERZIAN et al, 2011).

Outro importante vírus do JEC é o Rocio, que entre os anos de 1973 e 1980 causou grande epidemia de encefalite na região do Vale do Ribeira, SP, com mais de 1.000 casos notificados e aproximadamente 100 mortes (ROMANO-LIEBER, 2000). Após este surto, no ano de 1987, ainda foram encontradas evidências de que o ROCV estaria infectando a população do Vale do Ribeira, pois anticorpos IgM foram detectados em duas crianças (IVERSSON, 1989). Também, na cidade de Ribeirão Preto - SP, na mesma época, indivíduos com anticorpos hemaglutinantes para ROCV foram identificados em inquérito sorológico (FIGUEIREDO, 1986).

O Vírus do Oeste do Nilo (West Nile – WNV) é oriundo do Velho Mundo e amplamente distribuído na África, Europa e Ásia. O WNV foi introduzido nas Américas em 1999, onde causou grandes epidemias em todas as regiões dos Estados Unidos, acometendo 1,8 milhões de pessoas, sendo que, destas, mais de 12 mil casos tiveram doença neuro-invasiva. Durante a epidemia de WNV na cidade de Nova Iorque em 2002, surgiram os primeiros relatos de transmissão deste vírus através da transfusão sanguínea, e a partir daí introduziu-se nas rotinas de banco de sangue o teste para a detecção de genoma de WNV, em amostras de doadores de sangue (FRANCIS, 2012). Quanto à presença do WNV no Brasil, temos evidências sorológicas, em equinos no estado do Espírito Santo, e também em 1 caso humano no estado do Piauí

(PAUVOLID-CORREA et al, 2011; SILVA et al, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; MARTINS 2019).

Outros *Flavivirus*, como o DENV e Usutu, já foram descritos em doadores de sangue na Itália, Grécia e Porto Rico (MOHAMMED, 2008; ALLERING, 2012; PAPA, 2012). Em Porto Rico, em 2006, Beatty e colaboradores observaram que 1 em cada 1.300 doações estaria infectada com DENV (BEATTY, 2006). Não obstante, Dias et al, 2012, ao avaliar 500 amostras de doadores de sangue do Centro Regional de Hemoterapia do HC FMRP-USP, detectou DENV em 2 delas (DIAS, 2012). Também, notificou-se *Flavivirus* em banco de sangue de Campinas, SP, onde ZIKV foi observado em 0,16% dos doadores que declararam em entrevista não terem manifestado sintomas de doença febril aguda antes da doação (CUNHA et al, 2016).

Estes dados reforçam a necessidade de atenção nos bancos de sangue para minimizar os riscos de transmissão de arbovírus via transfusional.

1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NOS INFECTADOS POR ALPHAVIRUS E FLAVIVIRUS

No Brasil, os *Alphavirus* MAYV, EEEV, VEEV, WEEV e CHIKV, são capazes de causar doença humana. Também, infecções humanas e doença são causadas pelos *Flavivirus* ROCV, SLEV, YFV, os Dengue 1, 2, 3 e 4, BSV, CPCV, ILHV e ZIKV (FIGUEIREDO, 2007; FIGUEIREDO, 2000). Muitas das doenças causadas por estes arbovírus produzem sintomas semelhantes, como os de uma doença febril aguda com mialgia, artralgia, dor retro-orbital e erupção cutânea (MONDINI et al, 2007). Entretanto, estes arbovírus produzem desde infecção assintomática, doença febril aguda, febre hemorrágica, meningoencefalite a outras formas mais raras, como a síndrome de Guillan Barré e a doença congênita causadora de microcefalia (VAN DEN BERG et al. 2014, RASMUSSEN et al. 2016). No Brasil, como causador de doença febril aguda, o Dengue é o arbovírus que tem o maior número de casos notificados, com ampla distribuição no país.

Dentre os *Alphavirus* que produzem maior número de casos humanos no Brasil estão o MAYV e o CHIKV, que comumente causam doença febril aguda, somada a um importante acometimento das articulações que pode cronicar (SUHRBIER et al, 2012). Os *Alphavirus* apresentam tropismo por variados tipos celulares como monócitos e/ou macrófagos, células dendríticas, células endoteliais, células musculares

e do periósteo. A infecção destas células pode ocasionar quadros debilitantes de poliartralgia e/ou poliartrite que se estendem por semanas, meses ou anos (SUHRBIER et al, 2012; LEUNG, 2011).

As infecções por *Alphavirus* e *Flavivirus* podem evoluir de forma neuroinvasiva, pois acredita-se que a viremia destes vírus poderia levar a infecção de células endoteliais do Sistema Nervoso Central (SNC) com multiplicação e saída dos novos vírus pelo outro lado destas células, diretamente no SNC (CASTILLO-OLIVARES, 2004). Outra possível rota de infecção do SNC, seria o transporte retro-axonal em neurônios infectados do epitélio olfatório que facilitaria a transposição da barreira hematoencefálica (CASTILLO-OLIVARES, 2004; LEUNG, 2011; KONONCHIK, 2011). A origem das infecções neurotrópicas ainda não está completamente elucidada, mas estas infecções podem ser assintomáticas, ou originar quadros de doença febril aguda, meningite asséptica, meningoencefalite ou encefalite. Encefalites ocorrem mais em idosos, crianças e indivíduos imunodeprimidos (GOULD, 2008; ZACKS, 2010).

As infecções por *Flavivirus* neurotrópicos produzem sintomas como febre, mal-estar generalizado, retenção urinária, calafrios, dor de cabeça, confusão mental, dificuldade para caminhar e irritação meníngea, embora a maioria dos pacientes apresentem doença febril aguda que desaparece em alguns dias (SEJVAR, 2004; SEJVAR ET AL, 2003). Os vírus do Complexo da Encefalite Japonesa como o SLEV, ROCV ou WNV, podem causar doenças neurológicas graves que levam ao óbito ou deixam sequelas com distúrbios motores e cerebelares (BURKE, 2001). Outro *Flavivirus* neurotrópico que vem desafiando a ciência é o vírus Zika, que ao infectar mulheres grávidas, ultrapassa a barreira placentária, contaminando o bebê e causando microcefalia (RASMUSSEN et al, 2016)

Em relação aos *Alphavirus*, estudos de infecção do SNC, sugerem mecanismos de neuroinvasão para o VEEV onde o vírus poderia infectar os neurônios olfatórios através de capilares na base do neuroepitélio olfativo. (KONONCHIK, 2011; CHARLES et al, 1995). Outra possível via de infecção do SNC seria através do nervo trigêmeo, que pode ser atingido por replicação do VEEV no dente, incluindo tecido nervoso e polpa (CHARLES et al, 1995). Indivíduos com infecção por *Alphavirus* no SNC apresentam febre, dores de cabeça, náuseas, vômitos e anorexia. Também pode ocorrer irritação meníngea, confusão mental, sonolência, rigidez de nuca e encefalite, evoluindo ao coma e morte (ZACKS, 2010).

Em suma, as infecções por *Alphavirus* e *Flavivirus* podem causar doenças cuja gravidade depende de fatores inerentes ao vírus e ao hospedeiro. A gravidade das infecções pode ser influenciada por fatores como estado fisiológico e nutricional do indivíduo, predisposição genética, idade, sexo, além de infecções e imunidade prévia a outros arbovírus (ZACKS, 2010).

1.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DOS ALPHAVIRUS E FLAVIVIRUS

Infecções por *Alphavirus* e *Flavivirus* podem ser diagnosticadas laboratorialmente por testes virológicos e sorológicos. Uma técnica sorológica sensível e simples de realizar é a de inibição da hemaglutinação (HAI), que foi utilizada por muitos anos. Porém, a baixa especificidade e a incapacidade de discriminar imunoglobulinas G e M representaram uma grande desvantagem para a HAI (GUBLER, 1998; GUZMAN, 1996). Outro teste sorológico, bastante utilizado é o de neutralização que permite identificar com maior especificidade o vírus infectante. Entretanto, diante de pacientes com infecções secundárias por vírus do mesmo gênero, reações cruzadas podem ocorrer e portanto a identificação do vírus infectante passa a não ser fidedigna (GUBLER, 1998; GUZMAN, 1996). Além disso, o teste de neutralização, apesar da especificidade, é laborioso e demanda prolongado tempo para ser realizado, sendo inviável sua prática em rotina diagnóstica processando muitas amostras.

Atualmente, o teste sorológico mais utilizado no diagnóstico das infecções por *Alphavirus* e *Flavivirus* é o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), que é capaz de detectar anticorpos IgM presentes na fase aguda da doença (BURKE et al, 1982; GUBLER, 1998; INNIS ET AL, 1989; KUNO, 1991). Para o vírus Dengue, os títulos de IgM séricos são mais elevados nas infecções primárias que nas secundárias ou terciárias, dificultando o diagnóstico de infecções recorrentes (KUNO et al, 1991). O ELISA não é utilizado na identificação do sorotipo do Dengue infectante, mas pode ser aliado a outras técnicas de identificação viral (GUBLER, 1998). A detecção da imunoglobulina IgG específica por ELISA pode ser utilizada para diferenciar infecções primárias e secundárias pelo Dengue, quando existem altos títulos de IgG. A presença de reações cruzadas entre vírus do mesmo gênero é uma desvantagem da técnica de ELISA (ROMANO-LIEBER, 2000).

Outro método de detecção viral muito utilizado para *Alphavirus* e *Flavivirus* é o isolamento viral em cultivo celular, seguido por confirmação da infecção viral pela

técnica de Imunofluorescência Indireta. O isolamento viral é padrão-ouro no diagnóstico das arbovirose, porém, em pacientes com viremia baixa ou ausente este é inviável (GUBLER, 1998; GUZMAN, 1996). Testes imunocromatográficos vem sendo amplamente utilizados no diagnóstico de arbovirose, detectando antígenos virais em sangue, como a proteína NS1 no dengue (MATA, 2017).

Com o avanço da tecnologia, as técnicas moleculares de detecção dos arbovírus têm sido muito empregadas. A Reação em Cadeia da Polimerase precedida por Transcrição Reversa (RT-PCR) é eficaz e largamente utilizada na detecção genômica de vírus de RNA, incluindo *Alphavirus* e *Flavivirus*. A RT-PCR inovou o cenário do diagnóstico laboratorial, sendo um método rápido e sensível, que pode analisar amostras de sangue, urina, escarro e tecidos (SCHMITTGEN, 2001; KUNO, 1998).

A RT-PCR em tempo real para a detecção de arbovírus é uma evolução da técnica muito utilizada, pois permite que o *amplicon* seja visualizado durante a progressão da amplificação com base no acúmulo de fluorescência. Entre os principais fluoróforos utilizados em RT-PCR em tempo real destacam-se as sondas *Taqman* e o *SYBR Green*. A RT-PCR em tempo real mostra-se altamente sensível, específica, ágil e pouco dispendiosa. (BUSTIN, 2000; MACKAY, 2002; MACKAY, 2004).

1.7. JUSTIFICATIVA

No Brasil, todos os anos, temos tido epidemias causadas por *Flavivirus* (DENV, YFV e ZIKV) e *Alphavirus* (CHIKV e MAYV) (MASCHETETTI, 2013; MORENO, 2008; ESPOSITO, 2019; MOURÃO, 2012; ABAD-FRANCH et al. 2012; NETTO et al. 2017). Sabemos que estes arbovírus, podem ser veiculados por doadores virêmicos a receptores através da transfusão sanguínea. Receptores de sangue, muitos deles debilitados ou que fazem uso de imunossupressores, ao receberem sangue contaminado com tais vírus poderiam desenvolver doença febril aguda, encefalites ou febres hemorrágicas (FRANCIS et al, 2012; GAIBANI et al, 2012; PIERRO et al, 2013). Devido a nossas condições epidemiológicas, os médicos não costumam considerar a possibilidade da transmissão de arbovírus via transfusional. Não somente, ocorre falta de conhecimento sobre esta possibilidade de transmissão e também não são realizados exames diagnósticos que confirmem infecções por *Alphavirus* e *Flavivirus* em bancos de sangue. Este fato é preocupante, pois não é possível conhecer a morbidade e a mortalidade por estes vírus em enfermos.

Considerando as condições ideais de clima, fauna e flora para a manutenção dos arbovírus no Brasil e ainda a alta viremia nas infecções por *Alphavirus* e *Flavivirus*, doadores de sangue poderiam veicular estes vírus transmitindo-os via transfusão de sangue. Pretendemos mostrar que a hemoterapia brasileira necessita implementar técnicas de diagnóstico, inclusive aquelas de detecção genômica de *Alphavirus* e *Flavivirus* na rotina de análise dos sangues doados, o que permitiria livrar estes patógenos dos produtos do sangue no Brasil.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a epidemiologia das infecções por *Alphavirus* e *Flavivirus* em doadores de sangue com base em ensaios moleculares e sorológicos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Detectar genoma de *Alphavirus* e *Flavivirus* por RT-PCR em tempo real em amostras de doadores de sangue;
- ✓ Identificar por sequenciamento nucleotídico, *Alphavirus* e *Flavivirus* detectados nas amostras de doadores de sangue;
- ✓ Realizar estudos filogenéticos e de epidemiologia molecular em eventuais vírus infectantes das amostras de doadores de sangue;
- ✓ Pesquisar por ELISA anticorpos específicos IgM e IgG contra os vírus Mayaro e Chikungunya em amostras de doadores de sangue;
- ✓ Pesquisar por teste imunocromatográfico anticorpos específicos IgM e IgG para o vírus Zika, em amostras de doadores de sangue.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CPV-FMRP-USP) em parceria com o Banco de Sangue da Santa Casa de São Carlos. Todos os procedimentos adotados no trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Parecer Nº 2017/2.206.200).

3.1. AMOSTRAS

3.1.1. Amostras de doadores de sangue

Neste estudo foram analisadas 5.608 amostras de doadores de sangue do Banco de Sangue da Santa Casa de São Carlos. Estas amostras foram coletadas no período de fevereiro de 2017 a abril de 2018.

3.1.2 Preparação dos lotes das amostras de doadores de sangue

As amostras coletadas foram separadas em lotes contendo 4 amostras cada um. Cada lote recebeu 50µL de cada uma das 4 amostras correspondentes, totalizando 200µL. Destes, 140 µL foram utilizados para a extração do RNA viral e 60µL para o ELISA.

3.2 ESTOQUES VIRAIS

3.2.1. Preparação de estoques virais em células C6/36

Para a produção dos vírus-controles a serem utilizados nas RT-PCRs em tempo real e nos testes de neutralização, células C6/36, do mosquito *Aedes albopictus*, foram infectadas com sementes virais em estoque no Centro de Pesquisa em Virologia (IGARASHI, 1978). As células foram mantidas em frascos de 75 cm² (Corning Incorporated, EUA) a uma temperatura de 28° C, suplementadas com meio Leibovitz-15 (L-15) (Vitrocell, Campinas) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SBF)

(Vitrocell, Campinas), 1% de L-Glutamina 200Mm (Vitrocell, Campinas), 1% de antibióticos (penicilina 100U/mL, estreptomicina 1mg/mL) (Vitrocell, Campinas) e 10% do fosfato de triptose (Vitrocell, Campinas). Observada a confluência de 80% da monocamada, os frascos foram infectados com 200µl de cada um dos vírus citados na Tabela 1 e mantidos em estufa durante 1 hora para adsorção viral. Em seguida, adicionou-se o meio de manutenção L-15 com 2% de SBF, e os frascos foram armazenados em estufa a 28°C, respeitando o período de infecção que varia de 5 a 7 dias. Após este período, o sobrenadante, juntamente com a monocamada de células, foi centrifugado a 1000 rpm e a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi aliquoteado (500 µL por tubo) e armazenado a -70°C, após comprovar a infecção por teste de imunofluorescência indireta (IFA) e RT-PCR em tempo real (FIGUEIREDO, 1990).

Tabela 1. Sementes virais utilizadas neste estudo.

Vírus	Cepa	Gênero
Febre Amarela (YFV 17D)	17D	<i>Flavivirus</i>
Zika	SPH2015	<i>Flavivirus</i>
Mayaro (MAYV)	BeAr 20290	<i>Alphavirus</i>
Chikungunya (CHIKV)	S27- African	<i>Alphavirus</i>

Fonte: Elaborado pela autora, (2019).

3.2.2. Imunofluorescência Indireta

Para confirmar infecção viral nas células C6/36 realizou-se imunofluorescência indireta. As células infectadas foram lavadas com PBS estéril e centrifugadas a 1000 rpm e a 4°C, por 10 minutos. Após centrifugação, 10µl do precipitado celular foram adicionados a *spots* da lâmina de leitura, que depois de seca em temperatura ambiente, teve as células fixadas em acetona gelada, por 10 minutos. Na sequência, 20µl foram adicionados, na diluição 1:20, do soro de camundongos hiper-imunizados (estocados no laboratório) contra os vírus infectantes e após incubação a 37°C por 30 minutos, 20µl foram adicionados aos *spots* 20µl de um conjugado de anticorpo anti-IgG de camundongo à fluoresceína (FITC), na diluição 1:80 (Sigma-Aldrich, St. Louis EUA), incubando por mais 30 minutos a 37°C. As lâminas foram visualizadas em microscópio, sob luz ultravioleta, para verificar fluorescência citoplasmática indicativa da presença viral na célula.

3.2.3. Titulação dos Estoques Virais

O título de cada vírus descrito na Tabela 1 foi determinado por ensaio de placa. Para tanto, placas de 24 poços foram semeadas com 1×10^5 células VERO (500µl) e mantidas em meio MEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Vitrocell, Campinas, Brasil) a 37°C, por 24 horas. Para o teste de placas, fez-se diluições decimais, de 10^{-1} a 10^{-10} de todos os estoques virais, e estas foram adicionadas a placas de 24 poços. Estas placas foram incubadas por 1 hora em estufa a 37°C, sob leve agitação, para adsorção viral. Em seguida, 1ml de *overlay* foi adicionado aos poços, ou seja, uma solução de Agarose *Low-Melting* 1,5% (Estéril e diluído em PBS) a 70% de Meio MEM 4% SFB. (Sigma-Aldrich, St. Louis EUA) e de 2,5% de soro fetal bovino em MEM. Incubou-se a placa a 37°C com 5% de CO₂. Diariamente, as placas foram observadas para evidenciar o desenvolvimento de placas de lise, o que ocorreu de 3 a 6 dias após a infecção, dependendo do vírus. Para a revelação das placas, desprezou-se o *overlay* e fixaram-se as células com solução de formol a 10% em PBS, incubando-se por uma hora, em temperatura ambiente. Ao final, as células foram coradas com Cristal Violeta (Sigma-Aldrich, St. Louis EUA). Para o cálculo de títulos virais, os *plaques* individualizados e claramente visíveis foram contados. Com base nos números de *plaques* produzidos pela infecção, e conhecendo os volumes das diferentes diluições virais, calculou-se o título da semente viral em unidades formadoras de *plaques* por mililitro (UFP/ml).

3.3 RT-PCR EM TEMPO REAL

3.3.1. Extração do RNA e Síntese do DNA complementar

Os RNAs extraídos dos fluidos de cultura infectados com cada um dos vírus, bem como os de todas as amostras de doadores de sangue, foram submetidos a reação de transcriptase reversa utilizando primer randômico e também a enzima *SuperScript III* (Invitrogen, Carlsbad, EUA), segundo as instruções do fabricante.

3.3.2. RT-PCR para o gênero *Alphavirus*

Para detectar o genoma dos *Alphavirus* nas amostras de banco de sangue, foi utilizada uma RT-PCR em tempo real gênero-específica que utiliza os *primers* M2W e cM3W (mostrados na Tabela 2). O ensaio utiliza o sistema *SYBR Green* e detecta 27 espécies de *Alphavirus* com base em diferenças na Temperatura de *Melting* (T_M). Para os vírus pertencentes ao Complexo *Semiliki Forest* (SF), MAYV e CHIKV, a T_M varia entre 84,38 – 84,98°C, enquanto que para VEEV, EEEV, WEEV, MUCV e AURV, a T_M varia entre 83,05 - 83,95°C. Para produtos inespecíficos, a média da T_M é 74,5°C (ROMEIRO et al, 2015).

Tabela 2. *Primers* para a RT-PCR do gênero *Alphavirus*.

	Primers	Posição
<i>Forward</i>	M2W: YAGAGCDTTTTCGCAYSTRGCHW	164-186
<i>Reverse</i>	cM3W: ACATRAANKGNGTNGTRTCRAANCCDAYCC	568-597

Fonte: Elaborada pela autora, (2019)

3.3.3. RT-PCR em tempo real para o gênero *Flavivirus*

Para detectar o genoma de *Flavivirus* nas amostras deste estudo, fez-se RT-PCR em tempo real gênero-específica, usando os *primers* PF1S e PF2Rbis (mostrados na Tabela 3) e o sistema *SYBR Green*. As amostras positivas e negativas se diferenciam através da Temperatura de *Melting* (T_M). Para os *Flavivirus*, a T_M varia entre 82,89 e 83,78°C, e para os produtos inespecíficos, a média da T_M é 72,3°C (ROMEIRO et al, 2015).

Tabela 3. *Primers* PF1S e PF2R-bis utilizados na RT-PCR de *Flavivirus*.

	Primers	Posição
<i>Forward</i>	PF1S: 5-TGY-RTB-TAY -AAC- ATG-ATG-GG	8986-9006
<i>Reverse</i>	PF2R-bis: 5-GTG-TCC-CAI-CCNGCN-GTR- TC	9238-9258

Fonte: Elaborada pela autora, (2019)

3.3.4. RT-PCR em tempo real para vírus Zika

Dadas as grandes proporções da epidemia causada pelo vírus Zika, optamos em fazer uma RT-PCR específica em conjunto com a RT-PCR genérica de *Flavivirus*, usando a técnica desenvolvida por Lanciotti, et al 2008, cujos *primers* estão mostrados na Tabela 4 (LANCIOTTI, et al 2008).

Tabela 4. *Primers* ZIKV1086 e ZIKV1162c específicos para o vírus Zika.

	Primers	Posição
<i>Forward</i>	ZIKV1086: CCGCTGCCCAACACAAG	1086-1102
<i>Reverse</i>	ZIKV1162c: CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	1162-1139
<i>Sonda</i>	ZIKV1107 – FAM: AGCCTACCTTGACAAGCAGTCA- GACACTCAA	1107-1137

Fonte: Elaborada pela autora, (2019)

3.3.5. Sequenciamento nucleotídico

As amostras positivas na RT- PCR em tempo real tiveram os *amplicons* submetidos a sequenciamento nucleotídico. Para tanto, realizou-se uma PCR convencional com cDNAs das amostras e os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,5%. *Amplicons*, foram excisados do gel de agarose, purificados com o QIAquick Purification Kit (QIAGEN, Alemanha), e tiveram seus nucleotídeos sequenciados utilizando o ABI PRISM Big Dye Terminator v3.1 CycleSequencing kit®, segundo protocolo recomendado pelo fabricante em volume final de 20 µl, no sequenciador automático 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram analisadas e comparadas a outras disponibilizadas no GenBank (NCBI, USA), visando identificar o vírus infectante com base em similaridades e identidades, utilizando a ferramenta BLASTn (NCBI, USA).

3.4. ELISA

3.4.1. Detecção de anticorpos IgM e IgG para vírus Mayaro e Chikungunya

Anticorpos IgG e IgM contra os vírus Mayaro e Chikungunya foram detectados nas amostras utilizando ELISAs indiretos (FUMAGALLI et al, 2018; 2019). Para tanto,

placas de 96 poços foram sensibilizadas com a proteína recombinante E2 de cada um dos vírus, na concentração de 4µg/mL para CHIKV e 1µg/mL para MAYV sendo incubadas a 4°C *overnight*. Em seguida, as placas foram lavadas por 3 vezes com *PBS-Tween-0,05%*, bloqueadas com *PBS-Tween* contendo 10% de leite em pó desnatado e mantidas em estufa a 37°C por 2 horas. Na sequência, as placas foram lavadas por 3 vezes com *PBS-Tween-0,05%* e adicionou-se a amostra clínica em teste (anticorpo primário) na concentração 1/100, incubando-se a 37°C por 1 hora. Em seguida, as placas foram lavadas por mais 4 vezes com *PBS-Tween-0,05%* e anticorpo anti-immunoglobulina humana conjugado à peroxidase foi adicionado na diluição 1/2000 quando anti-IgG e 1/25000 quando anti-IgM (Sigma-Aldrich, St. Louis EUA). Novamente, as placas foram incubadas a 37°C por 1 hora e lavadas 5 vezes com *PBS-Tween-0,05%*. Ao final, as placas foram reveladas com substrato de peroxidase TMB e lidas em espectrofotômetro em 450nm, filtro de referência 620nm.

Os valores de ponto de corte foram calculados como a média dos controles negativos adicionando-se 3 desvios-padrão aos seus valores. As amostras foram testadas em duplicata, e aquelas que apresentaram valores acima do ponto de corte foram consideradas positivas.

$$\text{cut-off} = \text{Média D.O.negativos} + 3 \times \text{Desvio padrão}$$

3.4.2. Detecção de anticorpos IgM e IgG para o vírus Zika

Para detectar anticorpos IgM e IgG para o vírus Zika, foi utilizado o teste Quick Profile ZIKA, um ensaio imunocromatográfico rápido capaz de detectar simultaneamente anticorpos IgM e IgG em amostras de sangue total, soro ou plasma humano. Este teste foi realizado seguindo instruções do fabricante (LumiQuick, Califórnia EUA). Também, as amostras positivas neste teste rápido foram submetidas a um teste imunocromatográfico para detecção de IgM e IgG contra vírus Dengue (Biopix, São Paulo, Brasil).

3.4.3. Teste de neutralização por redução de plaques de lise

Para o teste de neutralização foram utilizadas apenas amostras IgG positivas no teste de ELISA. Os plasmas positivos tiveram o complemento inativado em banho

maria a 56°C por 45 minutos. Utilizaram-se placas de 24 poços contendo 1×10^5 células VERO (500µl), como explicado no tópico da titulação viral. As placas prontas, com monocamadas celulares confluentes, receberam em cada poço diluições dos soros em teste misturadas a 50 UFP/poço do vírus e previamente incubadas a 37°C por 1 hora. Portanto, neste teste de neutralização, manteve-se fixa a concentração de vírus e variando-se a concentração de amostra. Como controle positivo, utilizou-se meio de cultura estéril, o mesmo usado nas diluições sérica e viral.

No teste, todas as misturas soro/vírus foram incubadas a 37°C por 1 hora e em seguida adicionadas à placa de 24 poços, que foi posteriormente incubada em estufa à 37°C e 5% CO², sob leve agitação. Em seguida adicionou-se o meio overlay contendo 30% de Agarose *Low-Melting* 1,5% (Estéril e diluído em PBS) e 70% de Meio MEM 4% SFB, e a placa foi incubada novamente a 37°C e 5% CO² para a formação de *plaques* de lise. Após este período, as células foram fixadas à placa com formalina tamponada a 10% e coradas em Cristal Violeta (Sigma-Aldrich, St. Louis EUA) para visualizar e contar *plaques* de lise. Determinou-se ponto de corte de 50% para a neutralização dos *plaques* de lise por comparação com os do controle positivo.

4 RESULTADOS

Um total de 5.608 doadores do Banco de Sangue da Santa Casa de São Carlos, no período de fevereiro de 2017 a abril de 2018, foi convidado para participar da pesquisa assinando um termo de consentimento livre e esclarecido no dia da doação. Tratavam-se de 3.661 homens e 1.947 mulheres, proporção de 65,28% doadores do sexo masculino (M) e 34,72% doadores do sexo feminino (F), razão sexual M/F de 1,88. A idade dos doadores foi em média de 35,1 anos, sendo o mínimo de 18 anos e máximo de 69 anos. Todos os participantes negavam sintomas de doença como febre, mal-estar e vômitos.

As amostras plasmáticas dos 5.608 participantes foram utilizadas para testes de detecção genômica de *Alphavirus* e *Flavivirus* e para detecção específica de infecção pelos vírus Zika, Chikungunya e Mayaro.

4.1. PREPARAÇÃO DOS ESTOQUES VIRAIS

Os estoques virais foram produzidos em células C6/36 com 3 dias de incubação para *Alphavirus* e de 6 dias para *Flavivirus*. Os vírus nos estoques foram quantificados em unidades formadoras de *plaques* em células VERO, após confirmação da infecção por imunofluorescência, vide Tabela 5 e a Figura 4. O teste de imunofluorescência indireta evidenciou ao microscópio, sob luz ultravioleta, fluorescência citoplasmática dos antígenos virais durante processos replicativos celulares.

Tabela 5. Título viral por UFP/ml e tempo de incubação em dias.

Vírus	Tempo de Incubação	Título Viral (UFP/ml)
Febre Amarela (YFV 17D)	6 dias	3×10^4
Zika	6 dias	$8,25 \times 10^4$
Mayaro (MAYV)	3 dias	$2,45 \times 10^6$
Chikungunya (CHIKV)	3 dias	$3,65 \times 10^7$

Fonte: Elaborada pela autora, (2019)

Figura 4. Imunofluorescência Indireta e efeito citopático em células C6/36 para o vírus Zika. A – Células infectadas com o vírus Zika, identificado através da técnica de Imunofluorescência Indireta (Aumento 40X). B – Células não infectadas, em um aumento de 20X. C- Células C6/36 infectadas com o vírus Zika, com acentuado efeito citopático (20X). D- Células C6/36 não infectadas (20X).

Fonte: Autora, (2019)

Para a quantificação viral por plaques, diluições decimais da semente viral foram inoculadas, em quadruplicata, nas células Vero. Os plaques de lise visíveis e individualizados, como mostra a Figura 5, foram contados, permitindo, para o vírus Zika, determinar $8,25 \times 10^4$ UFP/ml.

Figura 5. Ensaio de *plaques* para titulação do vírus Zika. Observa-se uma placa de 24 poços, na qual os dois últimos poços da coluna 1 correspondem ao controle negativo do vírus. As diluições decimais da semente viral foram semeadas em quadruplicatas a partir da segunda coluna. Observam-se *plaques* bem individualizados nas colunas 10^{-2} e 10^{-3} que foram contados e permitiram determinar o título de ZIKV em $8,25 \times 10^4$ UFP/ml.

Fonte: Autora, (2019)

4.2. RT-PCR EM TEMPO REAL

4.2.1. RT-PCR em tempo real para os gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus*

Resultados confirmatórios da presença viral nos estoques, também, foram determinados por RT-PCR em tempo real, com método para detecção genérica de *Alphavirus* e *Flavivirus*.

Curvas de amplificação do MAYV por RT-PCR em tempo real gênero-específica para *Alphavirus* revelam o início da amplificação do MAYV no ciclo 26 e a amplificação de CHIKV no ciclo 30, como mostra a Figura 6. A curva de *melting* indica positividade na temperatura de 83,34°C.

Figura 6. Resultados da RT-PCR em tempo real para o gênero Alphavirus em teste das sementes de MAYV e CHIKV A) Curva de amplificação: iniciando no ciclo 26 para MAYV e no ciclo 30 para CHIKV. B) Curva de melting indicando positividade na temperatura de 83,34°C.

Fonte: Autora, (2019)

A curva de amplificação dos estoques virais para o gênero Flavivirus na RT-PCR em tempo real encontra-se na Figura 7. Observa-se a amplificação genômica do vírus da Febre Amarela a partir do 12o ciclo, com curva de melting na temperatura de 83,78°C.

Figura 7. Resultados da RT-PCR em tempo real para o gênero *Flavivirus* em teste com a semente de vírus da Febre Amarela. A) Curva de amplificação: em rosa, o vírus Febre Amarela amplificado a partir do ciclo 12. B) Curva de melting: em rosa, a amplificação do vírus Febre Amarela na temperatura de 83,78°C; em azul, uma amostra negativa.

Fonte: Autora, (2019)

Também, foram testados por RT-PCR em tempo real para os gêneros *Alpha-virus* e *Flavivirus*, 1.402 lotes de amostras de banco de sangue. Estas técnicas de RT-PCR em tempo real foram descritas por Romeiro et.al, 2015. Em nenhum dos 1.402 lotes de amostras de banco de sangue foi detectado qualquer genoma viral.

4.2.2 RT-PCR em tempo real específica para o vírus Zika

Os resultados das análises dos estoques virais pela RT-PCR em tempo real utilizando sonda e *primers* específicos para detectar RNA do ZIKV estão apresentados na Figura 8 e mostram que o mesmo amplificou a partir do ciclo 10.

Figura 8. RT-PCR em tempo real utilizando sonda e primers específicos para RNA do ZIKV analisando o estoque deste vírus. A) Curva de amplificação linear mostrando a amplificação do ZIKV a partir do ciclo 10; em vermelho, estão as amostras negativas. B) Curva de amplificação logarítmica apresentando a amplificação do vírus Zika em rosa.

Fonte: Autora, (2019)

Em seguida à padronização das reações para a amplificação do ZIKV, as amostras dos doadores foram submetidas aos testes para avaliação da presença do vírus. Dos 1.402 lotes de banco de sangue testados pela técnica descrita por Lanciotti

et. al, 2008, a detecção de ácido nucléico positivo (NAT) para o ZIKV ocorreu em quatro doadores de sangue (0,07%), com idade média de 38,75 anos; proporção sexual masculino/feminino, 33.3. Essas amostras apresentaram um limiar de ciclo (Ct) entre 36 e 42. Além disso, fizemos a quantificação. A quantidade de vírus viáveis foi medida em apenas uma amostra, com 360 unidades formadoras de placa (UFP / ml). Contudo, nas outras três amostras não foi possível estimar a carga viral, provavelmente devido à baixa viremia.

Os 4 doadores infectados com ZIKV eram assintomáticos, com sangue O positivo e idades variando entre 27 e 53 anos, 3 residentes na cidade de São Carlos e 1 na cidade de Ibaté (Tabela 6). Também, todos os doadores infectados com ZIKV negaram ter viajado para outros estados brasileiros por, pelo menos, 30 dias antes da coleta de sangue.

Dos 4 sangues infectados com o ZIKV, 3 foram transfundidos em 3 receptores, incluindo uma mulher com 56 anos e dois homens com 67 e 72 anos, todos submetidos a cirurgia cardíaca. Todavia, não temos informação sobre o desfecho clínico ocorrido nestes pacientes. Ainda, a outra bolsa de sangue foi descartada por possuir volume de sangue insuficiente para transfusão (Tabela 6).

Tabela 6. Dados dos doadores infectados com ZIKV.

Amostra	Ct	Idade	Sexo	Ci- dade	Data da Coleta	Situação da Bolsa	Tí- tulo
1	36	29	Feminino	São Carlos	07/05/2017	Transfun- dida	-----
2	38	46	Mascu- lino	São Carlos	07/05/2017	Não Trans- fundida	360
3	42	55	Feminino	Ibaté	27/10/2017	Transfun- dida	-----
4	42	33	Feminino	São Carlos	27/10/2017	Transfun- dida	-----

Fonte: Elaborado pela autora, (2019).

4.2.3. Sequenciamento nucleotídico

Para confirmar a detecção genômica do ZIKV em 1 das amostras de doadores, realizou-se seu sequenciamento nucleotídico. A sequência nucleotídica obtida com 500 pares de bases contendo genoma parcial de NS5 viral foi caracterizada diretamente a partir do plasma por sequenciamento Sanger, submetida ao BLAST e alinhada a sequências do GenBank. A análise, mostrada na árvore filogenética da Figura 9, indicou que o genótipo circulante na cidade de São Carlos é o asiático, sendo o mesmo que foi introduzido no Brasil em meados de 2013 e, com similaridade próxima à descrita anteriormente na Samoa, Polinésia e Tonga (FARIA et al, 2016). A Figura 9 apresenta a árvore filogenética de *Flavivirus* incluindo a sequências de ZIKV obtidas no presente estudo.

Figura 9: Árvore filogenética de nucleotídeos por Máxima Parcimônia, incluindo 500 pares de bases do gene NS5 de ZIKV detectados mundialmente e incluindo, em vermelho, a sequência oriunda de um dos nossos pacientes. Na árvore, números próximos a cada nó representam os valores de 1000 repetições de *bootstrap*. A escala representa o número de repetições/sítio.

Fonte: Autora, (2019)

4.3. DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM E IgG PARA MAYV, CHIKV E ZIKV

Os 1.402 lotes foram testados usando um ensaio imunocromatográfico rápido para a detecção simultânea de anticorpos específicos de IgG e IgM contra ZIKV. Enquanto que a detecção de anticorpos IgG e IgM para MAYV e CHIKV, nos mesmos lotes de doadores de sangue, foram testadas usando o método de ELISA.

Detectamos 43 (0,76% 43/5.608) doadores de sangue com IgM positivo para o ZIKV. Estes doadores tinham idade média de 37,09 anos e proporção sexual M/F, 1,31. A maioria dos IgM positivos para ZIKV ocorreu nos meses de novembro e dezembro de 2017 e abril de 2018. Observamos anticorpos IgM contra MAYV em 36 (0,64% 36/5.608) doadores de sangue. Estes doadores tinham média de idade, 30,05 anos e razão sexual M/F, 0,89. As amostras positivas para MAYV ocorreram em 2017 (33 amostras) e em 2018 (3 amostras) com maior incidência nos meses de fevereiro e março de 2017. Quanto a CHIKV, detectamos oito doadores IgM positivos para CHIKV (0,14% 8/5.608), com idade média de 35 anos e razão sexual M/F de 1,67. Dentre estes IgM positivos para CHIKV incluíram-se cinco doadores durante fevereiro e março de 2017 e outros 3 de fevereiro a abril de 2018.

Portanto, como mostra a Figura 10, os meses em que ocorreram maiores números de doadores IgM positivos para os *Alphavirus* testados foram os de fevereiro, março e dezembro de 2017 e abril de 2018. Nestes meses ocorrem, também, altos índices pluviométricos e altas temperaturas, o que se correlaciona com períodos epidêmicos destas arboviroses e mostra a influência do clima na incidência desses vírus.

Também, as amostras nas quais detectamos anticorpos IgM positivo para MAYV e CHIKV, e RT-PCR em tempo real negativa para *Alphavirus*, foram submetidas a RT-PCRs em tempo real específicas para o MAYV e CHIKV previamente descritas na literatura (Waggoner et al. 2018, Esposito e Fonseca 2017). Os resultados das RT-PCRs específicas para MAYV e CHIKV não mostraram amplificações e assim, corroboraram nossos primeiros resultados obtidos com a RT-PCR genérica para *Alphavirus*.

Considerando o total dos doadores IgG positivos (44 amostras) para ZIKV, MAYV e CHIKV, como mostra a Figura 11, notamos maior frequência de amostras IgG positivas para ZIKV (0,78 % 44/5608), seguido pelo MAYV (0,21% 11/5608). Dentre estas últimas amostras, curiosamente, nenhuma mostrou reação positiva de

IgG cruzada no ELISA para CHIKV. Neste trabalho, não observamos doadores com IgG positivo para CHIKV.

Igualmente, todas as amostras IgM e IgG positivas contra o ZIKV foram avaliadas com teste rápido para detectar antígenos NS1 de DENV, bem como IgG e IgM contra o vírus da Dengue. Nestes testes, não foram observadas quaisquer reações positivas para DENV. Portanto, não houve diagnóstico de dengue por NS1 ou reação cruzada antigênica entre ZIKV e DENV.

Figura 10. Doadores IgM positivos para MAYV, CHIKV e ZIKV, ao longo do período de coleta entre fevereiro de 2017 e abril de 2018, e também relacionando estes resultados com a temperatura média (°C) e o índice pluviométrico nestes meses (mm).

Fonte: Autora, (2019)

Figura 11. Positividade de amostras dos doadores de sangue IgG positivas para ZIKV, MAYV e CHIKV. Ressaltamos positivities mais elevadas para ZIKV e MAYV e ausência de IgG positivos contra CHIKV.

Fonte: Autora, (2019)

4.3.1. Teste de Neutralização das amostras IgG positivas

O ensaio de neutralização por redução de *plaques* permitiu avaliar anticorpos neutralizantes em amostras dos doadores de sangue que foram IgG positivas no ELISA e no teste imunocromatográfico. Também, permitiu determinar títulos de anticorpos neutralizantes contra ZIKV e MAYV.

Dentre as amostras dos 44 (0,78%) doadores de sangue IgG positivos para ZIKV, 25 apresentaram (44%) anticorpos neutralizantes para este vírus. Da mesma forma, observou-se que 25 dessas amostras apresentaram níveis elevados de anticorpos neutralizantes contra ZIKV, como mostra a Figura 12. Tal achado poderia estar relacionado a infecções recentes.

5 DISCUSSÃO

As infecções virais transmitidas por artrópodes afligem milhões de pessoas todos os anos e representam graves problemas de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, as quais abrigam condições ambientais ideais para a manutenção das arboviroses (FIGUEIREDO 2007).

O Brasil, em particular, testemunha surtos epidêmicos de dengue desde 1981 e, mais recentemente, os vírus chikungunya e Zika também tornaram-se uma grande preocupação e um importante desafio para a saúde pública (AZEVEDO et al 2015; CAMPOS et al 2015). As manifestações clínicas das infecções por arbovírus infectando seres humanos podem variar desde doença febril indiferenciada, moderada ou grave, erupções cutâneas e artralgia, meningoencefalites e síndrome hemorrágica.

Neste contexto, é de grande importância adotar medidas de controle para estas infecções e, dentre elas, adicionamos aqui o entendimento do risco potencial representado pela transmissão destes vírus, não por vetores, mas pela transfusão de sangue, e deve-se incluir a tomada de medidas profiláticas. Para ilustrar o problema da transmissão de arbovírus no sangue transfundido, no surto de meningoencefalite provocada pelo vírus do oeste do Nilo, na cidade de Nova York, ocorrido em 1999, observou-se a transmissão por via transfusional. (PROWSE 2003). Contudo, somente em 2002 ocorreram as primeiras constatações da infecção por WNV decorrente da transfusão de sangue contaminado. Como consequência disso, medidas de prevenção da infecção em produtos do sangue foram tomadas, com implantação de testes para detecção de ácido nucleico nos bancos de sangue norte-americanos (HARRINGTON et al. 2003). A exemplo do WNV, os demais arbovírus são passíveis de desencadear infecções por transfusão de sangue. Entretanto, poucas destas transmissões de arbovírus têm sido comprovadas (PETERSEN AND BUSCH 2010). A curta duração da viremia pode contribuir para esta baixa identificação que costuma diminuir rapidamente após o início dos sintomas. Portanto, tal fato dificulta a avaliação do risco da transmissão desses vírus por transfusão de sangue (MAGNUS et al. 2018).

Outros arbovírus, também, foram associados a infecções por transfusão de sangue. Reportou-se a transmissão de dengue por transfusão em Porto Rico. Dentre 12 bolsas de sangue positivas para DENV, em 3 delas o vírus replicante foi recuperado, demonstrando alto risco de transmissão via transfusional (MOHAMMED et al. 2008). Tal transmissão, foi também evidenciada por Linnen e colaboradores (2008),

que analisaram bolsas de sangue doadas de Honduras, Brasil e Austrália. Em Honduras, 9 de 2994 amostras (0,30%) foram RT-PCR positivas para DENV, contra 2 (0,04%) de 4858 no Brasil (LINNEN et al, 2008). Apesar disso, a frequência dessas ocorrências nos países endêmicos para dengue ainda é desconhecida.

Portanto, reconhecendo o real risco de transmissão de arbovírus por via transfusional, o foco deste trabalho foi investigar *Alphavirus* e *Flavivirus* em amostras do sangue de 5.608 doadores do Banco da Santa Casa de São Carlos. Estas amostras, coletadas entre 1º de fevereiro de 2017 e 27 de abril de 2018, foram analisadas por RT-PCR em tempo real usando *primers* genéricos para *Alphavirus* e *Flavivirus*, bem como *primers* específicos para ZIKV. Estes ensaios de *Alphavirus* e *Flavivirus* não evidenciaram genomas destes vírus nos sangues doados. Contudo, 4 doadores infectados com ZIKV foram diagnosticados quando foi utilizado RT-PCR específico e mais sensível. Estes doadores infectados eram assintomáticos e não viajaram recentemente para outros estados brasileiros pelo menos 30 dias antes da coleta de sangue. Curiosamente, 3 dos 4 produtos sangüíneos positivos para o ZIKV foram transfundidos em três receptores, incluindo uma mulher com 56 anos e dois homens com 67 e 72 anos, todos submetidos a cirurgia cardíaca. Lamentavelmente, por razões éticas, não tivemos acesso a informações sobre o ocorrido com os receptores.

As primeiras análises moleculares sobre a prevalência do vírus Zika em doadores de sangue foram realizadas durante epidemia na Polinésia Francesa, entre 2013 e 2014. Neste estudo, 2,8% dos 1.505 doadores voluntários de sangue assintomáticos tiveram resultados positivos confirmados para o RNA viral. Dentre estes doadores positivos, 26,2% declararam apresentar quadro clínico compatível com Zika três a dez dias após a doação. Os autores observaram alto índice de doadores de sangue assintomáticos, porém positivos para o RNA do ZIKV (42 doadores de 1.505). A partir deste achado, técnicas de inativação para vírus patogênicos, como tratamentos fotoquímico (amotosaleno) e ultravioleta, foram implementados nos bancos de sangue daquela região (MUSSO et al. 2014). Nesse mesmo estudo, nenhuma transmissão pela transfusão de sangue foi documentada (MUSSO et al. 2014). Contudo, a possibilidade de transmissão do ZIKV e de outros arbovírus pela transfusão sanguínea deve ser considerada mesmo em doadores assintomáticos, pois, nos mesmos, a viremia pode ocorrer sem sintomatologia. Recentemente, 2 prováveis casos de transmissão de ZIKV por transfusão sanguínea foram descritos na região de Campinas, SP. Em um destes, o genoma de ZIKV foi detectado em paciente que recebeu transfusão

do sangue de doador assintomático (CUNHA et al. 2016). No outro, o paciente foi transfundido com produto sanguíneo de doador infectado e provavelmente no período de incubação, portanto previamente à doença clínica (BARJAS-CASTRO et al. 2016).

No presente estudo, a frequência do RNA de ZIKV detectada no sangue de doadores (4 casos, 0,07%) foi menor do que os 0,16% e 2,7%, relatados em outros trabalhos brasileiros (MAGNUS et al., 2018; SLAVOV et al. 2017, respectivamente). Também, foi menor do que os 2,8% relatados por Musso e colaboradores (2014) na Polinésia Francesa e que 1,84% observado na Martinica (GALLIAN et al. 2017). Nossa positividade apenas mostrou-se mais elevada que aquela observada nos Estados Unidos, de 0,006% para RNA do ZIKV, em doadores de sangue (GALEL et al. 2017). Ainda, vale lembrar que outro estudo brasileiro não detectou genoma de ZIKV em 676 amostras de doadores da cidade de Vitória da Conquista, Bahia (GALEL et al. 2017; SHARMA et al. 2018).

No presente estudo, pudemos sequenciar o *amplicon* da região de NS5 do ZIKV de apenas 1 dos 4 indivíduos diagnosticados. Infelizmente, os outros *amplicons* foram perdidos não permitindo este sequenciamento. A sequência nucleotídica obtida mostrou tratar-se de cepa do ZIKV similar a outras descritas no Brasil, Américas e Polinésia. Este achado é compatível com ZIKV obtidos em epidemias ocorridas no país.

O diagnóstico da infecção por ZIKV feita com base na detecção do RNA viral pode ser feito em distintos tipos de amostras clínicas. Porém, devido à curta viremia comumente observada nas infecções por ZIKV, análises negativas em soro e urina não excluem infecção recente. Por outro lado, sabe-se que o desenvolvimento da resposta imune está relacionado com a queda da viremia por ZIKV. Concentrações crescentes de imunoglobulina M (IgM) pentamérica contra ZIKV no sangue periférico associam-se à queda nos teores de RNA viral detectáveis por RT-PCR. Por esta razão, a detecção de IgM contra ZIKV por ensaio imunoenzimático deve também ser recomendada para o diagnóstico destas infecções. Os níveis de IgM contra ZIKV ascendem no início da infecção, passando a serem detectáveis por ensaio imunoenzimático após o 4º dia de doença, permanecendo presentes por até 12 semanas, e em alguns casos, podem até persistir por longos períodos, chegando a anos. As imunoglobulinas G (IgG) costumam ascender mais lentamente que as M persistindo por muitos anos. Não obstante, no diagnóstico da infecção por ZIKV é possível quantificar a classe I de imunoglobulinas G, presente em distintos estágios

da infecção, incluindo convalescença e cura (FAYE et al. 2008; LANCIOTTI et al. 2008).

No presente estudo, 43 (0,76% - 43/5.608) doadores de sangue apresentaram IgM contra ZIKV. Os doadores positivos predominaram na estação chuvosa (novembro a março), coincidente com a maior atividade vetorial e a ocorrência de surtos de ZIKV. Quanto a IgG contra ZIKV, foram observados 44 (0,78 % - 44/5608) doadores de sangue positivos, dentre os quais 25 (0,44% - 25/5.608) tinham anticorpos neutralizantes e portanto mais específicos contra ZIKV. Nossos resultados identificaram mais casos de ZIKV em São Carlos nos anos de 2017 e 2018 do que os 8 notificados pela Secretaria de Saúde, sugerindo a existência de muitos casos assintomáticos e não notificados da doença (SECRETARIA DA SAÚDE, 2017).

Visando a detectar o vírus do dengue como fator confusional, produzindo reações soropositivas cruzadas com ZIKV nos doadores com anticorpos IgM e IgG contra ZIKV, seus soros foram submetidos a NS1 de Dengue e esta possibilidade, bem como a ausência de anticorpos IgM e IgG contra vírus do dengue, não corroboraram esta suposição. Portanto, nossos resultados indicam que os doadores realmente se infectaram com ZIKV, já que infecções por outros *Flavivirus* mais filogeneticamente relacionados, os DENV 1-4, não foram encontradas.

Os resultados aqui obtidos corroboram aqueles divulgados em outros trabalhos sobre a real possibilidade de contaminação por ZIKV através de transfusão sanguínea, e como em estudos prévios, ressaltamos ser importante a triagem para ZIKV nas bolsas de sangue, especialmente naquelas destinadas a gestantes, transfusões intrauterinas e pacientes imunodeprimidos. A grande preocupação com grávidas e fetos decorre da possibilidade de desenvolvimento da microcefalia por infecção fetal com ZIKV. Portanto, com relação ao ZIKV, nossos resultados justificam recomendar que, nos países epidêmicos, em todas as doações de sangue, se pesquise pelo genoma viral por RT-PCR. Outro procedimento poderia ser recomendado, a redução de patógenos nas amostras de sangue por procedimentos físicos ou químicos inócuos ao receptor, permitindo que, posteriormente, os produtos do sangue sejam transfundidos a gestantes e pacientes imunodeprimidos.

Nosso estudo também incluiu a pesquisa dos *Alphavirus* CHIKV e MAYV buscando por genomas virais, cujo resultado mostrou-se negativo. Realizamos pesquisa sorológica que evidenciou claramente infecções por estes vírus em doadores de sangue. Oito amostras de plasma mostraram-se IgM positivas para

CHIKV (0,14% 8/5.608). É importante ressaltar que estas amostras não mostraram IgM positivo para MAYV. Das 8 amostras IgM positivas para CHIKV, 5 foram coletadas de fevereiro a março de 2017 e outras 3 de fevereiro a abril de 2018. Esses dados são reforçados pela notificação de 136 casos de CHIKV em São Carlos no ano de 2017 e 2018, durante o período de coleta deste estudo (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Curiosamente, nenhum anticorpo IgG contra CHIKV foi detectado. Não encontramos uma explicação clara para isso mas, este achado é corroborado por 2 trabalhos recentes realizados com amostras de doadores da cidade de Ribeirão Preto, constatando ausência de IgG-positivos para CHIKV (NETTO et al. 2017; SLAVOV et al. 2017).

Deve-se lembrar que os 2 vírus pesquisados neste trabalho, o CHIKV e o MAYV, pertencem, dentre os *Alphavirus*, ao sorogrupo da Floresta Semlike, que se mostra de grande importância para a saúde pública. Dois genótipos do CHIKV transmitidos pelo *Aedes aegypti* foram introduzidos no Brasil, provavelmente em 2013, do Caribe e da Ásia. A partir de 2014 surgem os surtos de febre do CHIKV pelo genótipo viral asiático, que se espalhou pelo Nordeste e outras regiões do país causando desde então enormes epidemias onde casos graves, alguns fatais, foram observados. A febre do CHIKV afeta as articulações, e muitos pacientes mostram sinais de artrite aguda em tornozelos, pulsos e pequenas articulações das mãos. É importante ressaltar que estudos na Ásia mostraram em mais de 2% dos indivíduos que os sintomas articulares podem se tornar crônicos e confundir-se com a artrite reumatoide.

Quanto a CHIKV em bancos de sangue, entre 2005 e 2007, o vírus causou enorme epidemia em Ilhas do Oceano Índico e ali, constatou-se risco de transmissão do CHIKV por transfusão de sangue. Assim, a partir de 2006 a doação de sangue foi descontinuada, permanecendo apenas o serviço de doação de plaquetas para as quais a triagem sistemática do genoma do CHIKV foi realizada (BROUARD et al. 2008). Tais medidas de precaução também foram adotadas no norte da Itália em 2007, onde ocorreu inusitado surto de CHIKV. A indisponibilidade de um teste de laboratório para diagnóstico em componentes sanguíneos interrompeu os serviços de doação de sangue, com impacto considerável no suprimento sanguíneo naquela região e havendo necessidade de importação de sangue de outros centros (LIUMBRUNO et al. 2008). A infecção por CHIKV, assim como outras infecções causadas por arbovírus, em muitos casos pode ser assintomática, ainda assim, representa uma

ameaça à segurança na transfusão de sangue. Sissoko e colaboradores (2008) verificaram que aproximadamente uma em cada quatro infecções por CHIKV é assintomática (SISSOKO et al. 2008). Porém, doadores pré-sintomáticos ou assintomáticos com CHIKV podem potencialmente transmitir o patógeno devido à presença de níveis virêmicos relativamente altos (APPASSAKIJ et al. 2013). Desta forma, embora a transmissão transfusional do CHIKV não tenha sido documentada até o momento, esta possibilidade não pode ser subestimada e nossos resultados chamam atenção para ela.

Em pesquisas do genoma de CHIKV nos doadores de sangue, Gallian e colaboradores (2017) estudaram 16.386 amostras quanto à presença de RNA do CHIKV durante a epidemia nas ilhas francesas do Caribe entre 2014 e 2015, e detectaram em Martinica e Guadalupe positividade de 0,42% e 0,36%, respectivamente, além de IgG contra CHIKV de 41,2% e 48,1% (GALLIAN et al. 2017). Por outro lado, estudo brasileiro realizado com sangue de 676 doadores de Vitória da Conquista na Bahia não observou CHIKV (SHARMA et al. 2018). Este último resultado concorda com a ausência de RNA de CHIKV observada no presente estudo.

Nossos resultados indicam que durante o período estudado houve risco de transmissão do CHIKV por transfusão. Entretanto, maior risco teria ocorrido em passado recente, já que os 8 doadores IgM-positivos teriam se infectado há pouco tempo com este vírus. De qualquer maneira, devido à endemicidade e a recorrência de epidemias por CHIKV no Brasil, estudos adicionais, principalmente durante surtos, seriam recomendáveis para avaliar a presença de RNA e de anticorpos contra CHIKV em doadores de sangue e também, para conhecer o risco de transmissão transfusional. Finalmente, considerando que os doadores de sangue e provavelmente a maioria da população na região de estudo é imunologicamente susceptível ao CHIKV, seria imprescindível evitar as epidemias e a disseminação viral pelo controle do vetor *Aedes aegypti*. Isto, inclusive, evitaria a transmissão dessa virose através de transfusões de sangue.

Diferente de CHIKV, o MAYV é um vírus americano, endêmico na América do Sul, Central e Caribe. Trata-se de uma zoonose de primatas transmitida por mosquitos *Haemogogus* e que acomete com alta frequência populações amazônicas e do planalto central brasileiro. MAYV tem sido isolado esporadicamente durante períodos enzoóticos e durante epidemias, quando este número aumenta acentuadamente (ESPOSITO et al. 2017; VANCONCELOS et al. 1992).

Quanto à nossa pesquisa sobre MAYV, os resultados nos surpreenderam por realizarmos o estudo em regiões onde este vírus nunca foi relatado. Observamos anticorpos IgM contra MAYV em 36 (0,64% - 36/5608) doadores e todos relataram não terem viajado por pelo menos 30 dias antes da coleta de sangue. Estes doadores foram encontrados de fevereiro a março em 2017 e 2018, época do ano quente e chuvosa, classicamente propícia à transmissão de arboviroses por mosquitos. Ainda, detectamos outras 11 amostras IgG-positivas (0,19%) para MAYV. Considerando a possibilidade de reações anticórpicas cruzadas entre MAYV e CHIKV, o que dificulta o diagnóstico diferencial das infecções por estes vírus relacionados, as amostras plasmáticas IgG-positivas foram também processadas por teste de neutralização, e dentre estas, 2 foram neutralizantes para MAYV, não exibindo reação cruzada com CHIKV, sabidamente o *Alphavirus* mais filogeneticamente relacionado a MAYV no Brasil. Portanto, temos fortes indícios de que indivíduos tenham se infectado com MAYV recentemente na região. Pacientes com febre do MAYV poderiam ter sua doença clínica facilmente confundida com a de outras arboviroses como o dengue e particularmente o CHIKV, que produz acometimento articular semelhante. Entretanto, afastando reações cruzadas, nossos resultados sugerem que o MAYV possa ter circulado ou estar circulando não percebido no Estado de São Paulo.

No Brasil, altas taxas de anticorpos para MAYV foram encontradas em comunidades rurais da bacia amazônica (CAUSEY E MAROJA 1957; PINHEIRO et al. 1981). Um estudo em comunidades indígenas na região de Rio Negro indicou anticorpos para MAYV em 41,5% das amostras (ABAD-FRANCH et al. 2012). Casos de febre do MAYV com base em níveis consideráveis de soros IgM-positivos também foram relatados em Manaus, cidade com 2 milhões de habitantes e capital do estado do Amazonas (MOURÃO et al. 2012). Entretanto, o vírus poderia ser introduzido no Estado de São Paulo por viajantes. Coimbra e colaboradores (2007) detectaram um caso de infecção por MAYV em São Paulo em um paciente provavelmente infectado durante pescaria na cidade de Camapuã, região centro-oeste do país, em 2000 (COIMBRA et al, 2007). Sabe-se que os locais onde circula MAYV vêm se ampliando, e casos foram notificados no Planalto Central brasileiro. Inclusive, este espalhamento viral poderia estar coincidindo com o de outra zoonose de primatas transmitida por mosquitos *Haemogogus*, a febre amarela, com reservatório e vetor idênticos ao MAYV. Provavelmente locais onde ocorre a febre amarela silvestre possuem plenas condições para a circulação do MAYV. Em verdade, isto já foi evidenciado na década

de 80 em Santa Cruz de La Sierra, Bolívia, quando um surto de febre amarela sucedeu outro de MAYV (FIGUEIREDO et al, 1989). Isto poderia se repetir com o que vem ocorrendo nos últimos anos, de 2015 a 2019, no Sudeste do Brasil, com as grandes epizootias de primatas e a epidemia de febre amarela. Assim, a ocorrência da febre do MAYV possui plenas condições de ocorrer nas regiões nordeste e centro-leste paulistas (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018)

Quanto aos bancos de sangue, este é o primeiro trabalho que realiza pesquisa por MAYV e que mostra doadores recentemente infectados por este vírus. Ressaltamos que os pacientes, provavelmente, não tinham a virose no momento da doação porque genoma de MAYV, ou de CHIKV, não foi detectado nos sangues doados. Estes resultados sobre a circulação de MAYV no Estado de São Paulo são um alerta importante aos sistemas de vigilância em saúde, que devem estar atentos à circulação de mais este arbovírus. Para a vigilância, seria necessário divulgar aos profissionais da saúde sobre esta virose, a doença, e implantar métodos diagnósticos laboratoriais para MAYV. A pesquisa diagnóstica de MAYV deveria também ocorrer em bancos de sangue.

Em suma, nosso trabalho mostra que doadores de sangue no interior do Estado de São Paulo podem estar infectados com *Flavivirus* como o ZIKV e *Alphavirus* como o CHIKV e o MAYV. Diante disso, destacamos a importância de promover rastreamentos adequados para os principais arbovírus em bancos de sangue, especialmente na iminência de surtos, a fim de evitar o risco real de transmissão por doadores de sangue, e para que medidas que impeçam esta transmissão sejam implantadas resultando em transfusões sanguíneas mais seguras.

6 CONCLUSÃO

Em 2017 e 2018, analisando 5608 doadores de sangue da cidade de São Carlos, concluímos que:

- Quatro doadores estavam infectados com vírus Zika, representando risco de transmissão viral a receptores de produtos dos seus sangues;
- Oito doadores apresentavam anticorpos IgM específicos para CHIKV, mostrando que em período anterior recente, doadores ofereceriam risco de transmissão viral;
- A ocorrência de 36 doadores IgM-positivos para vírus Mayaro e também de 11 IgG-positivos e neutralizantes, sugere que em período anterior recente estes indivíduos teriam oferecido risco de transmissão viral a receptores de produtos dos seus sangues.
- Da mesma forma, concluímos que o vírus Mayaro deva ter circulado, ou estar circulando no Estado de São Paulo inadvertidamente, causando infecção humana.

7 REFERÊNCIAS¹

ABAD-FRANCH, F. et al. Mayaro virus infection in amazonia: a multimodel inference approach to risk factor assessment. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 10, p. e1846, 2012.

ALLERING L, JÖST H, EMMERICH P, GÜNTHER S, LATTWEIN E, SCHMIDT M, SEIFRIED E, SAMBRI V, HOURFAR K, SCHMIDT-CHANASIT J. Detection of Usutu virus infection in a healthy blood donor from south-west Germany, 2012. **Euro Surveill**, 13;17(50), Dec 2012.

APPASSAKIJ, H., P. KHUNTIKIJ, et al. "Viremic profiles in asymptomatic and symptomatic chikungunya fever: a blood transfusion threat?" **Transfusion**, 53(10 Pt 2): 2567-74, Nov 2013.

AZEVEDO, R. S. S., OLIVEIRA, C. S., et al. "Risco do chikungunya para o Brasil". **Rev. Saúde Pública**, v. 49, p 58, Set 2015.

BALEOTTI, F. G.; MORELI, M. L.; FIGUEIREDO, L. T. Brazilian Flavivirus phylogeny based on NS5. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 379-82, Apr 2003.

BARJAS-CASTRO, M. L., R. N. ANGERAMI, et al. (2016). "Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil." **Transfusion** 56(7), p. 1684-8, Jun 2016.

BEATTY ME, BIGGERSTAFF B, RIGAU J, PETERSEN L. Risk of transmission of dengue through blood transfusion in Puerto Rico. Presented at The **5th International Conference on Emerging Infectious Diseases**. Atlanta, GA. p.19-22, Ma. 2006.

BLANCOU, J. et al. Emerging or re-emerging bacterial zoonoses: factors of emergence, surveillance and control. **Vet Res**, v. 36, n. 3, p. 507-22, May-Jun 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde .**Técnico em hemoterapia: livro texto** / Ministério da Saúde, Secretaria de Gestão do Trabalho e da Educação na Saúde, Departamento de Gestão da Educação na Saúde – Brasília : Ministério da Saúde, 2013. 292 p.ISBN 978-85-334-1988-9.

BRASIL. Secretaria da Saúde. **Distribuição dos casos notificados e confirmados (autóctones e importados) da Doença Aguda pelo Vírus Zika, segundo o município de residência por mês de início de sintomas. Estado de São Paulo, 2017.**Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/zika/zika17_autoc_import.htm.Acesso em 22 jun.2019.

BRASIL. Secretaria da Saúde.**Distribuição dos casos de Chikungunya notificados e confirmados (autóctones e importados) no estado de São Paulo, segundo o município de residência, por mês de início de sintomas, ano 2018.**

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

Disponível em http://portal.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/chikung/chikung18_import_autoc_res.htm?attach=true. Acesso em 22 jun.2019.

BRASIL. Governo do estado de São Paulo- Secretaria de Estado da Saúde -**BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO FEBRE AMARELA – 2017**. Disponível em <file:///C:/Users/LUCIANA/Downloads/febre%20amarela%202017.pdf>. Acesso em 22 jun.2019.

BROUARD, C., P. BERNILLON, et al. "Estimated risk of Chikungunya viremic blood donation during an epidemic on Reunion Island in the Indian Ocean, 2005 to 2007." **Transfusion**, v. 48(7), p. 1333-41, Feb 2008.

BURKE, D. M., TP. Flaviviruses. In: **KNIFE, D. H., PM** (Ed.). Fields Virology. Philadelphia, USA: Wolters Kluwer Health, v.2, p.1043- 1126, 2001.

BURKE, D. S.; NISALAK, A.; USSERY, M. A. Antibody capture immunoassay detection of japanese encephalitis virus immunoglobulin m and g antibodies in cerebrospinal fluid. **J Clin Microbiol**, v. 16, n. 6, p. 1034-42, Dec 1982.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol**, v. 25, n. 2, p. 169-93, Oct 2000.

CAMPOS G. S., BANDEIRA A. C., SARDI S. I. "Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil". **Emerg Infect Dis**. 21(10), p. 1885-6, Oct 2015.

CASTILLO-OLIVARES, J.; WOOD, J. West Nile virus infection of horses. **Vet Res**, v. 35, n. 4, p. 467-83, Jul-Aug 2004.

CAUSEY, O. R. AND O. M. MAROJA. "Mayaro virus: a new human disease agent. III. Investigation of an epidemic of acute febrile illness on the river Guama in Para, Brazil, and isolation of Mayaro virus as causative agent." **Am J Trop Med Hyg** 6(6), p. 1017-23, Nov1957.

CHARLES, P. C. et al. Mechanism of neuroinvasion of Venezuelan equine encephalitis virus in the mouse. **Virology**, v. 208, n. 2, p. 662-71, Apr 1995.

CHAVEZ, J. H. et al. Domain III peptides from Flavivirus envelope protein are useful antigens for serologic diagnosis and targets for immunization. **Biologicals**, v. 38, n. 6, p. 613-8, Nov 2010.

CHRISTOU, L. The global burden of bacterial and viral zoonotic infections. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 3, p. 326-30, Mar 2011.

CLETON N., KOOPMANS M., et al. "Come fly with me: Review of clinically important arboviruses for global travelers". **Journal of Clinical Virology** 55(3), p. 191-203, Jul 2012.

COIMBRA, T. L. M., SANTOS C. L.S. et al. "Mayaro virus: imported cases of human infection in São Paulo State, Brazil". S. Paulo, **Rev. Inst. Med. trop.**, v. 49(4), p. 221-224, Jul- Aug 2007.

CUNHA, M. S., D. L. ESPOSITO, et al. "First Complete Genome Sequence of Zika Virus (Flaviviridae, Flavivirus) from an Autochthonous Transmission in Brazil." **Genome Announc** 4(2), Mar 2016.

DIAS LL, AMARILLA AA, POLONI TR, COVAS DT, AQUINO VH, FIGUEIREDO LT. Detection of dengue virus in sera of Brazilian blood donors. **Transfusion**, v. 52(8), p.1667-71, Aug 2012.

DUTTA SK, PAL T, SAHA B, MANDAL S, TRIPATHI A. Copy number variation of Chikungunya ECSA virus with disease symptoms among Indian patients. **J Med Virol**, v. 86(8), p. 1386-92, Aug 2014.

ESPOSITO D. L. A. AND FONSECA B. A. L. Sensitivity and detection of chikungunya viral genetic material using several PCR-based approaches. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 50(4), p. 465-469, Jul-Aug 2017.

FARIA, N. R., R. AZEVEDO, et al. "Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings." **Science**, v. 352(6283), p. 345-349, Apr 2016.

FAYE, O., A. DUPRESSOIR, et al. "One-step RT-PCR for detection of Zika virus." **J Clin Virol**, v. 43(1), p. 96-101, Sep 2008.

FIGUEIREDO, L. T. [The use of Aedes albopictus C6/36 cells in the propagation and classification of arbovirus of the Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae families]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 23, n. 1, p. 13-8, Jan-Mar 1990.

_____. The Brazilian Flaviviruses. **Microbes Infect**, v. 2, n. 13, p. 1643-9, Nov 2000.

_____. Emergent arboviruses in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 2, p. 224-9, Mar-Apr 2007.

FIGUEIREDO, L. T.; DA ROSA, A. P.; FIORILLO, A. M. [Arbovirus antibodies levels in subjects of the region of Ribeirao Preto, SP (Brazil)]. **Rev Saude Publica**, v. 20, n. 3, p. 204-11, Jun 1986.

FIGUEIREDO, L.T.; NOGUEIRA, R.M.; CAVALCANTI, S.M.; SCHATZMAYR, H; DA ROSA , A.T. Study of two different enzyme immunoassays for the detection of Mayaro virus antibodies. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 84(3):303-7, Sep 1989.

FRANCIS, R. O. et al. West Nile virus infection in blood donors in the New York City area during the 2010 seasonal epidemic. **Transfusion**, v. 52, n. 12, p. 2664-70, Dec 2012.

FUMAGALLI, M. J. et al. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent assay to detect antibodies targeting the recombinant envelope protein 2 of Mayaro virus. **J Clin Microbiol**, Feb 2019.

FUMAGALLI, M. J. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant envelope protein 2 antigen for diagnosis of Chikungunya virus. **Viol J**, v 15(1), p. 112, Jul 2018.

GAIBANI, P. et al. Detection of Usutu-virus-specific IgG in blood donors from northern Italy. Vector Borne **Zoonotic Dis**, v. 12, n. 5, p. 431-3, May 2012.

GALEL, S. A., P. C. WILLIAMSON, et al. "First Zika-positive donations in the continental United States." **Transfusion**, v. 57(3pt2), p. 762-769, Feb 2017.

GALLIAN, P., A. CABIE, et al. "Zika virus in asymptomatic blood donors in Martinique." **Blood**, v. 129(2), p. 263-266, Nov 2017.

GALLIAN, P., I. LEPARC-GOFFART, et al. "Epidemiology of Chikungunya Virus Outbreaks in Guadeloupe and Martinique, 2014: An Observational Study in Volunteer Blood Donors." **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11(1), p. 5254, Jan 2014.

GLUBER, D. J., KUNO, G., MARKOFF, L. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M. H., P. M. (Ed.). Fields Virology. Philadelphia, USA: **Wolters Kluwer Health**, v.2, p.2502-2601, 2007.

GO, Y. Y.; BALASURIYA, U. B.; LEE, C. K. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of Alphaviruses and Flaviviruses. **Clin Exp Vaccine Res**, v. 3, n. 1, p. 58-77, Jan 2014.

GOULD, E. A.; SOLOMON, T. Pathogenic Flaviviruses. **Lancet**, v. 371, n. 9611, p. 500-9, Feb 2008.

GRIFFIN, D. E. Alphaviruses. In: KNIPE, D. M. H., P.M. (Ed.). Fields Virology. Philadelphia, USA: **Wolters Kluwer Health**, v.2, p.2502-2601, 2007.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 3, p. 480-96, Jul 1998.

GLUBER, D. J., KUNO, G., MARKOFF, L. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M. H., P. M. (Ed.). Fields Virology. Philadelphia, USA: **Wolters Kluwer Health**, v.2, p.2502-2601, 2007.

GUERRA C. C. C. Fim da doação remunerada de sangue no Brasil faz 25 anos. **Rev. bras. hematol. hemoter**, v. 27(1), p.1-4, Mar 2005.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Advances in dengue diagnosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 3, n. 6, p. 621-7, Nov 1996.

HALSEY, E. S. et al. Mayaro virus infection, Amazon Basin region, Peru, 2010-2013. **Emerg Infect Dis**, v. 19, n. 11, p. 1839-42, Nov 2013.

HASSING, R. J. et al. Imported Mayaro virus infection in the Netherlands. **J Infect**, v. 61, n. 4, p. 343-5, Oct 2010.

HUBALEK, Z.; RUDOLF, I. Tick-borne viruses in Europe. **Parasitol Res**, v. 111, n. 1, p. 9-36, Jul 2012.

HUTCHIN P., History of blood transfusion: A tercentennial look. **Surgery**, v. 64 (3), p. 685–700, Sep 1968.

International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV. <https://talk.ictvonline.org>. Acesso em 5 de mar 2019.

IGARASHI, A. Isolation of a Singh's Aedes albopictus cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. **J Gen Virol**, v. 40, n. 3, p. 531-44, Sep 1978.

INNIS, B. L. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. **Am J Trop Med Hyg**, v. 40, n. 4, p. 418-27, Apr 1989.

INTERNATIONAL-SOCIETY-FOR-INFECTIOUS-DISEASES. Chikungunya in America. **Brookline**, USA 2014.

IVERSSON, L. B.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P.; ROSA, M. D. [Recent occurrence of human infection by Rocio arbovirus in the Valley of Ribeira region]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 31, n. 1, p. 28-31, Jan-Feb 1989.

IVERSSON, L. B., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., RODRIGUES, S. G., ROSA, M. D. B.. Human disease caused by venezuelan equine encephalitis sub-type IF in Ribeira Valley, São Paulo, Brazil. **Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. New Orleans, USA: 143 p. 1990.

JONES, K. E. et al. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990-3, Feb 2008.

JOSE, J.; SNYDER, J. E.; KUHN, R. J. A structural and functional perspective of Alphavirus replication and assembly. **Future Microbiol**, v. 4, n. 7, p. 837-56, Sep 2009.

JUNQUEIRA P. C., Rosenblit J., Hamerschlak N. A história da hemoterapia no Brasil. **Rev. bras. hematol. hemoter**, v. 27(3), p.201-207, Jul. 2005.

KENNEDY M. S., EHSAN A. Terapia transfusional. In: Hamerning D. M. Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão. Rio de Janeiro: **Revinter**, p. 343 – 361, 2006.

KONONCHIK, J. P., JR.; HERNANDEZ, R.; BROWN, D. T. An alternative pathway for Alphavirus entry. **Virol J**, v. 8, p. 304, 2011.

KUNO, G. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. **J Virol Methods**, v. 72, n. 1, p. 27-41, May 1998.

KUNO, G.; GOMEZ, I.; GUBLER, D. J. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. **J Virol Methods**, v. 33, n. 1-2, p. 101-13, Jun 1991.

LANCIOTTI, R.S.; KOSOY, O.L.; LAVEN, J.J.; VELEZ, J.O.; LAMBERT, A.J.; JOHNSON, A.J.; STANFIELD, S.M.; DUFFY, M.R. Genetic and Sorologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Disease**, v.14, n.8, p. 1232-1239, Aug 2008.

LEUNG, J. Y.; NG, M. M.; CHU, J. J. Replication of Alphaviruses: a review on the entry process of Alphaviruses into cells. **Adv Virol**, v. 2011, p. 249640, Jul. 2011.

LEWTHWAITE, P., R. VASANTHAPURAM, et al. "Chikungunya virus and central nervous system infections in children, India." **Emerg Infect Dis**, v. 15(2), p. 329-31, Feb 2009.

LINDENBACH, D. B.; H-J., T.; RICE, C. M. Flaviviridae: The viruses and their Replication. In: **KNIFE, D. M. H., P.M.** (Ed.). Fields Virology. Philadelphia, USA: Wolters Kluwer Health, v.1, p.1101-1152, 2007.

LINNEN J. M., VINELLI E., et al. "Dengue viremia in blood donors from Honduras, Brazil, and Australia". **Transfusion** , v. 48(7), p.1355-62, May 2008.

LIUMBRUNO, G. M., D. CALTERI, et al. "The Chikungunya epidemic in Italy and its repercussion on the blood system." **Blood Transfus**, v. 6(4), p. 199-210, Oct 2008.

MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clin Microbiol Infect**, v. 10, n. 3, p. 190-212, Mar 2004.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 6, p. 1292-305, Mar 2002.

MAGNUS, M. M., D. L. A. ESPOSITO, et al. "Risk of Zika virus transmission by blood donations in Brazil." **Hematol Transfus Cell Ther**, v. 40(3), p. 250-254, Sep 2018.

MARTINS L. C. et al. First isolation of West Nile virus in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 17, p. 114, Jan 2019.

MASCHERETTI, M. et al. [Yellow fever: reemerging in the state of Sao Paulo, Brazil, 2009]. **Rev Saude Publica**, v. 47, n. 5, p. 881-9, Oct 2013.

MATA V.E. et al. Accuracy and reliability of an NS1 rapid immunochromatographic test for DENV-1 diagnosis at point of care and in the laboratory. **BMC Infect Dis**, v. 17(1), p.594, Aug 2017.

MESLIN, F. X. Global aspects of emerging and potential zoonoses: a WHO perspective. **Emerg Infect Dis**, v. 3, n. 2, p. 223-8, Apr-Jun 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018.** <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/2019-002.pdf>. Acesso em 5 de mar de 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Febre do Nilo Ocidental**. 2018. <http://portalms.saude.gov.br/o-ministro/942-saude-de-a-a-z/febre-do-nilo-ocidental/21160-vigilancia-nilo>. Acesso em: 5 de mar de 2019.

MONDINI, A. et al. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. **J Clin Virol**, v. 40, n. 1, p. 84-6, Sep 2007.

MOHAMMED H., LINNEN J. M., et al. "Dengue virus in blood donations, Puerto Rico, 2005". **Transfusion**, v. 48(7), p.1348-54, Aug 2008.

MORENO, E. S. et al. Reemergence of yellow fever: detection of transmission in the State of Sao Paulo, Brazil, 2008. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 3, p. 290-6, May-Jun 2011.

MOURAO, M. P. et al. Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007-2008. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 12, n. 1, p. 42-6, Jan 2012.

MUSSO, D., T. NHAN, 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(14), Apr 2014

NETTO, E. M., A. MOREIRA-SOTO, et al. "High Zika Virus Seroprevalence in Salvador, Northeastern Brazil Limits the Potential for Further Outbreaks." **MBio**, v. 8(6), p.14, Nov 2017.

NEUMAYR, A. et al. Mayaro virus infection in traveler returning from Amazon Basin, northern Peru. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 4, p. 695-6, Apr 2012.

OMARJEE, R. et al. Importance of case definition to monitor ongoing outbreak of chikungunya virus on a background of actively circulating dengue virus, St Martin, December 2013 to January 2014. **Euro Surveill**, v. 19, n. 13, Apr 2014.

OSORIO, J. E., YUILL, T. M. Venezuelan equine encephalitis. In: BERAN, G. W. (Ed.). Handbook of zoonoses. Boca Raton: **CRC Press**, p.33-46, 1997.

PAPA A, POLITIS C, TSOUKALA A, EGLEZOU A, BAKALOU DI V, HATZITAKI M, TSERGOULI K. West Nile virus lineage 2 from blood donor, **Greece. Emerg Infect Dis**, v. 18(4), p. 688-9, Apr 2012.

PAUVOLID-CORREA, A. et al. Ilheus virus isolation in the Pantanal, west-central Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 7, p. e2318, Jul 2013.

PETERSEN, L. R. AND M. P. Busch. "Transfusion-transmitted arboviruses." **Vox Sang**, v. 98(4), p. 495-503, May 2010.

PIERRO, A. et al. Detection of specific antibodies against West Nile and Usutu viruses in healthy blood donors in northern Italy, 2010-2011. **Clin Microbiol Infect**, v. 19, n. 10, p. E451-3, Oct 2013.

PINHEIRO, F. P., R. B. FREITAS, et al. "An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological findings." **Am J Trop Med Hyg**, v. 30(3), p. 674-81, May 1981.

PROWSE, C. V. "An ABC for West Nile virus." **Transfus Med**, v. 13(1), p. 1-7, Feb 2003.

RASMUSSEN, S. A., D. J. JAMIESON, et al. (2016). "Zika Virus and Birth Defects--Reviewing the Evidence for Causality." **N Engl J Med**, v. 374(20), p. 1981-7, May 2016.

RECEVEUR, M. C. et al. Infection with Mayaro virus in a French traveller returning from the Amazon region, Brazil, January, 2010. **Euro Surveill**, v. 15, n. 18, May 2010.

RICE, L. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: KNIPE, D. M. H., P.M. (Ed.). Fields Virology. Philadelphia, USA: **Wolters Kluwer Health**, v.2, 2007.

ROBINSON, M. C. "An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features." **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 49(1), p. 28-32, Jan 1955.

ROCCO, I. M. et al. St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in Sao Paulo State, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 47, n. 5, p. 281-5, Sep-Oct 2005.

RODRIGUES FARIA, N., J. LOURENCO, et al. "Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014-2015." **PLoS Curr**, v. 1, p. 8, Feb 2016.

ROMANO-LIEBER, N. S.; IVERSSON, L. B. Serological survey on arbovirus infection in residents of an ecological reserve. **Rev Saude Publica**, v. 34, n. 3, p. 236-42, Jun 2000.

ROMEIRO MF, DE SOUZA WM, TOLARDO AL, VIEIRA LC, HENRIQUES DA, DE ARAUJO J, et al. A real-time RT-PCR for rapid detection and quantification of mosquito-borne Alphaviruses. **Archives of virology**, v.161(11), p. 3171-7, Nov 2016.

ROMEIRO MF, SOUZA WM, TOLARDO AL, VIEIRA LC, COLOMBO TE, AQUINO VH, et al. Evaluation and optimization of SYBR Green real-time reverse transcription polymerase chain reaction as a tool for diagnosis of the Flavivirus genus in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49(3), p. 279-85, May-Jun 2016.

ROSA, R. et al. Isolation of saint louis encephalitis virus from a horse with neurological disease in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 11, p. e2537, Nov 2013.

SARAIVA J. C. P. A história da hemoterapia no Brasil. **Rev. bras. hematol. hemoter**, v. 27(3), p. 153-158, Jul 2005.

SCHMITTGEN, T. D. Real-time quantitative PCR. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 383-5, Dec 2001.

SCHWARZ H. P. Historical review: Karl Landsteiner and his major contributions to haematology. **British Journal of Haematology**, v. 121, p. 556–565, May 2003.

SEJVAR, J. J. West Nile virus and "poliomyelitis". **Neurology**, v. 63, n. 2, p. 206-7, Jul 2004.

SEJVAR, J. J. et al. Acute flaccid paralysis and West Nile virus infection. **Emerg Infect Dis**, v. 9, n. 7, p. 788-93, Jul 2003.

SHARMA, R., L. COSTA SANTOS, et al. (2018) "Surveillance of donated blood during the 2016 arbovirus outbreak in Brazil." **J Med Virol**, v. 90(8), p.1406-1410, Aug 2018.

SILVA, J. R. et al. Serologic survey of West Nile virus in horses from Central-West, Northeast and Southeast Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 921-3, Nov 2013.

SISSOKO, D., A. MOENDANDZE, et al. "Seroprevalence and risk factors of chikungunya virus infection in Mayotte, Indian Ocean, 2005-2006: a population-based survey." **PLoS One**, v. 3(8), p. 3066, Aug 2008.

SLAVOV, S. N., K. K. OTAGUIRI, et al. "Seroprevalence of Chikungunya virus in blood donors from Northern and Southeastern Brazil." **Hematol Transfus Cell Ther**, v. 40(4), p. 358-362, Oct 2017.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The Alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiol Rev**, v. 58, n. 3, p. 491-562, Sep 1994.

SUHRBIER, A.; JAFFAR-BANDJEE, M. C.; GASQUE, P. Arthritogenic Alphaviruses--an overview. **Nat Rev Rheumatol**, v. 8, n. 7, p. 420-9, Jul 2012.

TERZIAN, A. C. et al. Detection of Saint Louis encephalitis virus in Dengue-suspected cases during a dengue 3 outbreak. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 11, n. 3, p. 291-300, Mar 2011.

VASCONCELOS, P. F. et al. Epidemiology of encephalitis caused by arbovirus in the Brazilian Amazonia. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 33, n. 6, p. 465-76, Nov-Dec 1991.

VASCONCELOS, P.F., TRAVASSOS DA ROSA, A.P., DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, J.F., PINHEIRO, F.P. Clinical and ecoepidemiological situation of human arbovíruses in Brazilian Amazonia. **Braz J Assoc Advanc Sci**, v. 44, p.117–24, Mar 1992.

VASCONCELOS, P. F. C., ROSA, A.P.A.T., PINHEIRO, F.P., SILOPE, R.E., ROSA, J.F.S.T., RODRIGUES, S.G. Arboviruses patogenic for man in Brazil. In: **ROSA APAT, V. P., ROSA JFST** (Ed.). An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries. Belém, Brasil.: Instituto Evandro Chagas, p.72-99, 1998.

WATKINS W.M. The ABO blood group system: historical background. **Transfusion Medicine**, v. 11, p. 243-265, Dec 2001.

ZACKS, M. A.; PAESSLER, S. Encephalitic Alphaviruses. **Vet Microbiol**, v. 140, n. 3-4, p. 281-6, Jan 2010.

ANEXOS

Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Carlos
Comissão de Ética Médica
Rua Paulino Botelho de Abreu Sampaio, 573 - Cep:13561-060 - Tel: (16) 3509-1279

Ofício: 002/17

São Carlos, 31 de janeiro de 2017

Ilm. Sr.

LuizTadeu Moraes Figueiredo
Orientador

Ilmo. Sr.

Antonio Valério Morillas Junior
Provedor da ISCMSC

REF ao Projeto: Estudo sobre infecções por ALphavirus e Flavivirus em amostras de banco de sangue.

Em relação ao projeto citado temos a informar a V.Sas que o mesmo foi analisado pela Comissão de Ética Médica, não havendo impedimento ético para a realização referenciado.

Atenciosamente.

Dr. Fabrizio Margarido Albertini
Presidente da Comissão de Ética Médica

Recebido em
31/01/17

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo sobre infecções por Alphavirus e Flavivirus em amostras de banco de sangue

Pesquisador: Marília Farignoli Romeiro

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 72065317.8.0000.5440

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.206.200

Apresentação do Projeto:

Os autores pretendem investigar a presença de material genéticos de vírus da dengue, zika e chikungunya em doadores de sangue do banco de sangue da Santa Casa de São Carlos nos períodos de epidemia, a fim de averiguar a magnitude da disseminação dos referidos vírus em indivíduos assintomáticos. Para isso, pretendem pesquisar a presença de material genético dos vírus por RT-PCR.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Detectar Alphavirus e Flavivirus em amostras de doadores de sangue utilizando RT-PCRs em tempo real gênero-específicas seguidas por sequenciamento nucleotídico.

Objetivo Secundário: Pesquisar Flavivirus e Alphavirus por RT-PCR em tempo real em amostras de doadores de sangue, durante epidemias de Dengue; Pesquisar Flavivirus e Alphavirus por RT-PCR em tempo real em amostras de doadores de sangue, durante epidemias do vírus Zika; Pesquisar Flavivirus e Alphavirus por RT-PCR em tempo real em amostras de doadores de sangue, durante eventuais epidemias do vírus Chikungunya; Identificar por sequenciamento nucleotídico, Alphavirus e Flavivirus detectados nas amostras de doadores de sangue; Realizar tentativas de isolamento dos vírus detectados nas amostras de doadores de sangue; Identificar por Sequenciamento de Nova Geração e analisar por ferramentas de bioinformática o genoma

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 2.206.200

completo de Alphavirus e Flavivirus detectados nas amostras de doadores de sangue; Realizar estudos de epidemiologia molecular e inferências filogenéticas de possíveis vírus infectantes das amostras de doadores de sangue.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os autores afirmam que os riscos são baixos, exceto o de formação de hematoma no local da coleta de sangue.

Não comentam a respeito dos riscos de quebra de sigilo e das medidas para evitá-lo.

Os benefícios foram mencionados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os autores afirmam: "serão coletadas aproximadamente 2000 amostras de doadores de sangue no período de fevereiro a abril de 2017", no banco de sangue da Santa Casa de São Carlos. Há documento da comissão de ética da referida instituição que aprovou a realização, inclusive com a dispensa de aplicação do TCLE aos doadores de sangue daquela instituição.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os autores solicitam a dispensa da aplicação do TCLE, sob a argumentação de que os doadores de sangue já autorizam coleta de alíquota de sangue para os testes sorológicos e que sua amostra fica armazenada pelo período de 6 meses depois da doação.

Recomendações:

não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa, assim como a solicitação de dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO			
Bairro: MONTE ALEGRE		CEP: 14.048-900	
UF: SP	Município: RIBEIRAO PRETO		
Telefone: (16)3602-2228	Fax: (16)3633-1144	E-mail: cep@hcrp.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO

Continuação do Parecer: 2.206.200

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_865561.pdf	27/07/2017 13:39:23		Aceito
Orçamento	Folha_UPC_Nova.pdf	27/07/2017 13:38:28	Marilia Farignoli Romeiro	Aceito
Orçamento	Orcamento_Projeto_Sta_Casa_Sao_Carlos.pdf	24/07/2017 16:50:07	Marilia Farignoli Romeiro	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_plataforma_brasil_correta.pdf	24/07/2017 16:49:34	Marilia Farignoli Romeiro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Banco_de_Sangue_Sta_Casa_Sao_Carlos.pdf	23/03/2017 14:49:36	Marilia Farignoli Romeiro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Carta_dispenza_TCLE.pdf	23/03/2017 14:45:25	Marilia Farignoli Romeiro	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_DE_EXECUCAO.docx	23/03/2017 14:11:23	Marilia Farignoli Romeiro	Aceito
Outros	Carta_BS_USP.pdf	23/03/2017 14:08:24	Marilia Farignoli Romeiro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRÃO PRETO, 08 de Agosto de 2017

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Estudo sobre infecções por Alphavirus e Flavivirus em amostras de banco de sangue

Pesquisador: Marília Farignoli Romeiro

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 72065317.8.0000.5440

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.485.392

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda ao projeto de pesquisa, conforme carta datada de 04 de dezembro de 2017.

Justificativa da Emenda:

A emenda foi proposta pois a técnica utilizada no estudo a PCR quando utilizada em conjunto com a técnica de ELISA pode nos fornecer resultados mais seguros, visto que doadores de sangue são indivíduos saudáveis e possuem baixo risco de terem infecções por arbovírus como descrito na literatura referenciada no projeto. Destacamos que ambos os projetos foram anexados (original e alterado), e todas as alterações estão destacadas em amarelo. Também enviamos o relatório de andamento deste projeto.

Objetivo da Pesquisa:

Incluído o objetivo:

• Pesquisar anticorpos das classes IgG e IgM para Alphavirus e Flavivirus em amostras de doadores de sangue, através da técnica de ELISA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não modificado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Inclusão do método:

4.2. Detecção de Anticorpos IgG e IgM Para a detecção de anticorpos IgG e IgM contra Alphavirus e

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO

Continuação do Parecer: 2.485.392

Flavivirus nas amostras coletadas, serão sensibilizadas placas de 96 poços, adicionando-se 50µL por poço da proteína específica para o vírus de interesse, diluída em tampão Carbonato Bicarbonato pH 9.6, em concentração desejada (4ug/mL). As placas serão incubadas overnight a 4°C Após o tempo sensibilização os poços das placas serão lavados 3 vezes com 200µL de solução de PBS-Tween-0,05%. Em seguida o bloqueio é realizado utilizando 150µL de solução bloqueadora (PBS-Tween 10% de leite desnatado mólico) e as placas serão incubadas por 2 horas a 37°C. Passado o tempo de bloqueio as placas serão lavadas 3 vezes com 150µL de solução de PBS-Tween-0,05% e será adicionado 50µL de soro a ser testado, diluídos em solução bloqueadora (diluição 1/100, amostras feitas em duplicatas), será incubado por 1h em câmara úmida à 37°C. Após esse processo as placas serão lavadas 4 vezes com 150µL de solução de PBS-Tween-0,05% e será adicionado 50µL do anticorpo secundário conjugado à peroxidase, (Anti IgG ou IgM, contra Humano) na diluição

1/2000 (segundo a recomendação do fabricante) em solução bloqueadora. As placas serão novamente incubadas a 37°C por 1 hora e lavadas 5 vezes com 150µL de solução de PBS-Tween-0,05%. Terminada esta etapa, passaremos para a fase de revelação do resultado, na qual 100µL de substrato de peroxidase TMB é adicionado as placas e será feita a leitura em espectrofotômetro em 450m, filtro de referência 620m.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram devidamente apresentados ao CEP.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP analisou e aprovou a emenda bem como o Projeto de pesquisa datado 31/01/18 e tomou ciência do Relatório de Atividades do Doutorado de 10 de Março de 2017 a 10 de Dezembro de 2017.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1067017_E1.pdf	01/02/2018 10:22:21		Aceito
Projeto Detalhado	Projeto_Alterado_Emenda_Destaque_	01/02/2018	Marília Farignoli	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

**USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO**

Continuação do Parecer: 2.485.392

/ Brochura Investigador	Amarelo.pdf	10:21:47	Romeiro	Aceito
Outros	Relatorio_Plataforma_Brasil.pdf	31/01/2018 15:58:30	Marilia Farignoli Romeiro	Aceito
Outros	Carta_Emenda_CEP_Projeto_Sao_Carlos.pdf	26/01/2018 16:11:46	Marilia Farignoli Romeiro	Aceito
Orçamento	Folha_UPC_Nova.pdf	27/07/2017 13:38:28	Marilia Farignoli Romeiro	Aceito
Orçamento	Orcamento_Projeto_Sta_Casa_Sao_Carlos.pdf	24/07/2017 16:50:07	Marilia Farignoli Romeiro	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_plataforma_brasil_correta.pdf	24/07/2017 16:49:34	Marilia Farignoli Romeiro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Carta_dispenza_TCLE.pdf	23/03/2017 14:45:25	Marilia Farignoli Romeiro	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_DE_EXECUCAO.docx	23/03/2017 14:11:23	Marilia Farignoli Romeiro	Aceito
Outros	Carta_BS_USP.pdf	23/03/2017 14:08:24	Marilia Farignoli Romeiro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 05 de Fevereiro de 2018

Assinado por:

MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br