NATHÁLIA CAROLINE SANTIAGO E SOUZA

**Dengue transfusional: estudo de doadores de sangue durante uma epidemia
na cidade de Barretos-SP no ano de 2013**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientador: Dr. José Eduardo Levi

SÃO PAULO

2019

NATHÁLIA CAROLINE SANTIAGO E SOUZA

**Dengue transfusional: estudo de doadores de sangue durante uma epidemia
na cidade de Barretos-SP no ano de 2013**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientador: Dr. José Eduardo Levi

SÃO PAULO

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Nathália Caroline Santiago e
Dengue transfusional : estudo de doadores de
sangue durante uma epidemia na cidade de Barretos-
SP no ano de 2013 / Nathália Caroline Santiago e
Souza. -- São Paulo, 2019.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: José Eduardo Levi.

Descritores: 1.Dengue transfusional 2.Bancos de
sangue 3.Epidemias 4.Vírus da dengue 5.Reação em
cadeia da polimerase em tempo real 6.Sorotipagem
7.Sorologia 8.Surtos de doenças

USP/FM/DBD-244/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, por todo apoio, dedicação e amor incondicional em todas as etapas da minha vida. Sem vocês nada disso seria possível!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. José Eduardo Levi pela sua atenção, orientação e confiança em meu trabalho.

Ao Dr. Cláudio Sergio Pannuti pelas oportunidades, colaborações e ensinamentos ao longo destes anos que trabalhamos juntos.

À Clara Felix, que me ensinou e auxiliou em muitos aspectos e que se tornou uma grande amiga durante estes anos de projetos e trabalhos.

À todos os funcionários do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo pelo carinho com o qual me receberam e pelos ensinamentos que contribuíram muito para minha formação profissional.

Ao Hospital de Câncer de Barretos e à Dr.^a Vanessa Almeida Pádua pela colaboração e por tornarem este trabalho possível.

Ao CNPq pelo apoio financeiro para a execução deste trabalho.

Aos meus pais, Maria de Fátima Souza Santiago e Souza e Carlos José de Souza, as pessoas mais importantes da minha vida, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e confiaram em meu potencial.

Ao meu noivo, Luís Carlos Silva Gómez Alvarez, pelo apoio, amor, compreensão e companheirismo.

Às minhas amigas queridas por todos estes anos de amizade e incentivo.

Meu muito obrigada à todos! Vocês foram essenciais para que esta jornada fosse concluída.

“Você ganha força, coragem e confiança
através de cada experiência em que você
realmente para e encara o medo de
frente.”

(Eleanor Roosevelt)

“O período de maior ganho em
conhecimento e experiência é o período
mais difícil da vida de alguém.”

(Dalai Lama)

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 DENGUE	16
1.1.1 Vírus da dengue	16
1.1.2 Transmissão	17
1.1.3 Manifestações clínicas	18
1.1.4 Diagnóstico	21
1.1.4.1 Métodos sorológicos	23
1.1.4.2 Métodos moleculares	26
1.1.4.3 Isolamento e identificação viral	28
1.1.5 Epidemiologia	28
1.1.5.1 Histórico da dengue no Brasil	29
1.2 BANCO DE SANGUE	32
1.2.1 Coleta, processamento e armazenamento	35
1.2.2 Exames laboratoriais do doador	37
1.2.2.1 Exames para triagem de agentes transmissíveis pelo sangue	38
1.2.3 Transfusão de hemocomponentes e hemovigilância	39
1.3 DENGUE EM DOADORES DE SANGUE	41
1.3.1 Dengue transfusional	43
2 JUSTIFICATIVA	48
3 OBJETIVO	50
3.1 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	50
4 CASUÍSTICA	51
4.1 CRITÉRIO DE INCLUSÃO	51
4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	51
5 MATERIAS E MÉTODOS	53

5.1 TESTES LABORATORIAIS	53
5.1.1 Pesquisa de anticorpos anti-DENV do tipo IgM.....	53
5.1.2 Pesquisa de anticorpos anti-DENV do tipo IgG	54
5.1.3 Extração dos ácidos nucleicos	55
5.1.4 Síntese do cDNA.....	56
5.1.5 PCRs em tempo real para detecção do RNA viral.....	57
5.1.6 Sorotipagem das amostras DENV RNA positivo	58
6 RESULTADOS	59
6.1 PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-DENV DO TIPO IGM E IGG.....	59
6.2 PCRS EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DO RNA VIRAL	61
6.3 SOROTIPAGEM DAS AMOSTRAS DENGUE RNA POSITIVO	61
6.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS DE SOROLOGIA DAS AMOSTRAS DENV-RNA POSITIVAS	62
6.5 COMPARAÇÃO DE RESULTADOS SOROLÓGICOS E DE QPCR DOS DOADORES COM CASOS SINTOMÁTICOS NOTIFICADOS DE DENGUE.....	62
7 DISCUSSÃO.....	64
8 CONCLUSÃO.....	73
9 ANEXOS.....	74
REFERÊNCIAS	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	Microlitro
µm	Micromolar
AABB	<i>American Association for Blood Banks</i>
ABO	Sistema de grupos sanguíneos ABO
ACD	Citrato ácido dextrose
ADE	<i>Antibody-Dependent Enhancement</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
cDNA	DNA complementar
CG	Concentrado de granulócitos
CH	Concentrado de Hemácias
CHKV	Chikungunya virus
CMV	Citomegalovírus
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
cols.	Colaboradores
CP	Concentrado de plaquetas
CPD	Citrato fosfato dextrose
CPDA-1	Citrato fosfato dextrose adenina
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DCC	Dengue com complicações
DENV	Vírus da Dengue
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ou ácido desoxirribonucleico
DO	Densidades ópticas
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FHD	Febre hemorrágica da dengue
hab.	Habitantes
HBV	Vírus da Hepatite B
HCB	Hospital de Câncer de Barretos
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HRP	Enzima peroxidase proveniente de raiz de rábano silvestre
HTLV	Vírus T-Linfotrópico Humano
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
JEV	<i>Japanese Encephalitis virus</i>
M	Massa molar
mL	Millilitro
NAT	<i>Nucleic Acid Tests</i>
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
nm	Nanometro

nM	Nanomolar
NS1	Proteína viral não estrutural -1
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAHO	Organização Pan-Americana de Saúde
PAI	Pesquisa de anticorpos antieritrocitários irregulares
PC	Plasma comum
PFC	Plasma fresco congelado
PFC24	Plasma fresco congelado em 24 horas
PIC	Plasma isento de crioprecipitado
PRNT	<i>Plaque Reduction Neutralization Test</i>
qPCR	<i>Real-time polymerase chain reaction</i>
RDC	Resolução da diretoria colegiada
Rh	Sistema de grupo sanguíneo Rh
RhD	Antígeno Rh
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> ou ácido ribonucleico
RT-PCR	<i>Reverse-transcriptase polymerase chain reaction</i>
RT-qPCR	Reverse-transcriptase real-time polymerase chain reaction
SCD	Síndrome do choque da dengue
SE	Semana epidemiológica
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SLE	<i>St. Louis encephalitis virus</i>
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMA	<i>Transcription-mediated amplification</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
UTR	<i>Untranslated region</i>
WNV	<i>West Nile virus</i>
YFV	<i>Yellow Fever virus</i>
ZKV	Zika virus

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 - A: Representação da estrutura viral, indicando as proteínas M, E e C e o material genético. B: Esquema do genoma e poliproteína precursora originando as proteínas virais estruturais e não estruturais	16
Figura 2 - <i>Aedes aegypti</i>	17
Figura 3 - Ciclo urbano do DENV	18
Figura 4 – Ciclo do sangue	33
Figura 5 - Esquemas dos sistemas de bolsas duplo, triplo e quádruplo.	35
Figura 6 - Esquema representativo do ELISA de captura para IgM anti-DENV	54
Figura 7 - Esquema representativo do ELISA indireto para IgG anti-DENV	55
Figura 8 - Esquema do princípio de extração da plataforma NucliSENS easyMag® (Biomérieux™)	56
Gráfico 1 – Casos de notificados de dengue por mês nos anos de 2009 a 2013 na cidade de Barretos/SP, segundo dados do SINAN.	49
Gráfico 2 – Número de doadores coletados e positividade de IgM e IgG anti-DENV por semana	60
Gráfico 3 – Número de casos sintomáticos notificados, doadores testados e resultados de qPCR, IgM e IgG anti-DENV no período de março a abril de 2013.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Diferenças dos sintomas clínicos e laboratoriais da dengue e chikungunya	21
Tabela 2 – Diferenças dos sintomas clínicos e laboratoriais da dengue e zika.	22
Tabela 3 - Testes para diagnóstico diferencial da dengue	22
Tabela 4 - Teste para agentes infecciosos obrigatórios em todo território nacional..	38
Tabela 5 - Indicações clínicas para transfusões dos principais hemocomponentes .	40
Tabela 6 – Resumo dos artigos revisados sobre viremia de DENV em doadores de sangue.....	42
Tabela 7 - Sequência de primers e sonda genéricos	58
Tabela 8 - Sequências de primers e sondas para sorotipagem do DENV	58
Tabela 9 – Distribuição dos doadores por mês de coleta	59
Tabela 10 - Resultados sorologias IgM e IgG anti-DENV	59
Tabela 11 - Resultado das amostras positivas nos qPCRs genéricos.....	61
Tabela 12 – Resultado da sorotipagem das amostras DENV RNA positivas.....	61
Tabela 13 - Resultados das sorologias das amostras qPCR positivas	62

RESUMO

Souza NCS. *Dengue transfusional*: estudo de doadores de sangue durante uma epidemia na cidade de Barretos-SP no ano de 2013 [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

O crescimento da dengue no Brasil e no mundo nas últimas duas décadas renovou o interesse por esta doença, causada por 4 sorotipos distintos de um arbovírus da família *Flaviviridae*. Após 30 anos de epidemias sucessivas, o vírus da dengue (DENV) está presente em todo território brasileiro causando milhares de casos da doença todos os anos. Sabe-se que a maioria das infecções pelo vírus da dengue são assintomáticas. Sendo assim, um indivíduo infectado e assintomático pode apresentar-se e ser elegível à doação de sangue, podendo levar a transmissão transfusional deste agente. Em Barretos, houve uma epidemia de dengue no ano de 2013, com uma incidência de 3.836 casos/100.000 habitantes. Nessa cidade localiza-se o Hospital de Câncer de Barretos (HCB), onde funciona o Hemonúcleo responsável pela Medicina Transfusional da instituição e de outros serviços de saúde da cidade e região, realizando em torno de 1.090 transfusões por mês. Para avaliarmos o eventual risco de transmissão transfusional da dengue, testamos 1.822 amostras dos doadores de sangue do HCB coletadas de fevereiro a maio de 2013, com o objetivo de estimar a incidência e prevalência de marcadores de exposição à dengue e determinar a prevalência de sorotipos de dengue em casos de doadores virêmicos. A detecção do RNA do DENV foi realizada por RT-qPCR no aparelho QuantStudio5 PCR System (ThermoFischer™) utilizando primers e sonda genéricos, que detectam todos os sorotipos virais. As amostras positivas foram submetidas a outro qPCR com primers e sondas específicas para cada sorotipo do DENV. Os testes sorológicos para a detecção de anticorpos IgM e IgG anti-DENV foram realizados pelo método de ELISA utilizando-se os kits comerciais ELISA Dengue Virus IgG CaptureDxSelect™ e ELISA Dengue Virus IgM CaptureDxSelect™ (Focus Diagnostics). Encontramos uma taxa de 0,38% de amostras positivas para DENV RNA, todas sorotipadas como DENV-4. A soroprevalência encontrada foi de 51,3% e a incidência de IgM anti-DENV foi de 16,8%. Esta incidência observada reflete a amplitude da epidemia na população geral e indica um alto risco de transmissão transfusional deste agente nessa ocasião.

Descritores: dengue transfusional; bancos de sangue; epidemias; vírus da dengue; Reação em cadeia da polimerase em tempo real; sorotipagem; sorologia; surtos de doenças.

ABSTRACT

Souza NCS. *Transfusional-Transmitted Dengue*: study of blood donors during an outbreak in the city of Barretos-SP in 2013 [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina", "Universidade de São Paulo"; 2019.

The growth of dengue in Brazil and the world over the last two decades has renewed interest in this disease, caused by 4 distinct serotypes of an arbovirus from the *Flaviviridae* family. After 30 years of successive epidemics, the dengue virus (DENV) is present throughout Brazil, causing thousands of cases of the disease each year. It is known that the majority of dengue virus infections are asymptomatic. Thus, an infected and asymptomatic individual may present and be eligible for blood donation, which may lead to the transfusion transmission of this agent. In Barretos, there was a large outbreak of dengue in 2013, reaching an incidence of 3,836 /100,000 inhabitants. In this city is located the Hospital de Cancer de Barretos (HCB), where it operates the blood bank responsible for the transfusional medicine of the institution and other health services on the region, performing on average, 1,090 transfusions per month. In order to study the possible risk of transfusional transmission of dengue, we tested 1,822 samples of serum or plasma from all blood donors of the HCB collected from February to May of 2013, with the aim to estimate the incidence and prevalence of markers of dengue exposure and determine the prevalence of DENV serotypes in cases of viremic donors. The detection of dengue RNA was performed by qPCR in the QuantStudio5 PCR System (ThermoFischer™) using generic primers and probe that detect all viral serotypes. Positive samples were submitted to another qPCR to with primers and probes specific for each DENV serotype. The serologic tests for detection of IgM and IgG antibodies anti-DENV used were ELISA Dengue Virus IgG CaptureDxSelect™ and ELISA Dengue Virus IgM CaptureDxSelect™ (Focus Diagnostics). We found a rate of 0.38% of samples positive for DENV RNA, all serotyped as DENV-4. The seroprevalence found was 51.3% and the incidence of anti-DENV IgM was 16.8%. This incidence observed reflects the amplitude of the epidemic in the general population and indicates a high risk of transfusional transmission of this agent at that time period.

Descriptors: transfusion transmitted dengue; blood banks; epidemics; dengue virus; real-time polymerase chain reaction; serotyping; serology; disease outbreaks..

1 INTRODUÇÃO

1.1 DENGUE

A dengue é uma doença infecciosa não contagiosa causada por qualquer um dos quatro sorotipos do vírus da Dengue (DENV) que são antigenicamente distintos, mas geneticamente relacionados, denominados sorotipos 1, 2, 3 e 4 (DENV-1, -2, -3 e -4), cada um deles agrupados em genótipos (1).

1.1.1 Vírus da dengue

Os DENVs pertencem à família *Flaviridae*, gênero *Flavivirus*. São partículas virais esféricas, de 50 a 60 nm de diâmetro, constituídas por um nucleocapsídeo envolto por um envelope lipídico onde estão presentes as glicoproteínas de superfície viral. Seu genoma consiste de uma fita simples de RNA com aproximadamente 11.000 nucleotídeos e somente uma fase aberta de leitura (ORF – Open Reading Frame) flanqueada por duas regiões não codificadoras (5' e 3' UTRs). A única ORF codifica uma poliproteína precursora que sofre processamentos co- e pós-traducionais através de clivagens realizadas por proteases virais e do hospedeiro que originam as três proteínas virais estruturais (C, capsídeo; M, membrana, que é expressa como a proteína prM, precursora da M; E, envelope) responsáveis pela formação do nucleocapsídeo, e as sete não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) essenciais para a replicação e empacotamento viral (Figura 1) (1-4).

Figura 1 - A: Representação da estrutura viral, indicando as proteínas M, E e C e o material genético. B: Esquema do genoma e poliproteína precursora originando as proteínas virais estruturais e não estruturais

Fonte: adaptado de Angel e Valle, 2013

1.1.2 Transmissão

A principal via de transmissão dos DENV ocorre por mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* o principal vetor no Brasil (Figura 2) (5).

Figura 2 - *Aedes aegypti*

Fonte: Paulo Whitaker/Reuters (disponível em:

<https://saude.estadao.com.br/noticias/geral,estado-vai-pagar-extras-a-agentes-para-reforçar-combate-ao-mosquito-da-dengue,70002803761>)

A fêmea adulta do mosquito se infecta durante o repasto sanguíneo em um humano infectado e virêmico por DENV. Primeiro, o vírus replica-se no intestino médio, atinge a hemocèle e a hemolinfa, e, em seguida, obtém acesso aos diferentes tecidos do inseto. Após a replicação viral nas glândulas salivares, o mosquito infectado pode transmitir o vírus para outro ser humano. O período que se inicia na ingestão do vírus pelo mosquito até que o mesmo atinja as glândulas salivares e possa ser transmitido a outro hospedeiro é chamado de incubação extrínseca e pode durar em média de 8 a 12 dias (6). Este período de incubação depende de vários fatores como: características virais, hospedeiras, vetoriais e ambientais, sendo que a temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes já que pode alterar o tempo de incubação de 5-33 dias a 25°C para 2-15 dias a 30°C. A transmissão viral pode ocorrer também por via vertical, quando o mosquito fêmea infectado transmite o vírus através dos ovos para seus descendentes, mas a importância epidemiológica deste modo de transmissão é incerta (7, 8).

Ao ser transmitido para o ser humano pela picada do mosquito infectado durante o repasto sanguíneo, onde são inoculadas cerca de 100 ou menos partículas virais, o DENV passa por um período de replicação chamado de incubação intrínseca e que dura geralmente de 3 a 10 dias, podendo chegar até 14 dias (6-10). Após o

período de incubação, a viremia pode durar em média 4-5 dias (podendo chegar até 7 dias) durante a doença aguda ou assintomática. Todo este ciclo de transmissão urbana está representado na Figura 3 (11, 12).

Figura 3 - Ciclo urbano do DENV
Fonte: Adaptado de Guzman et al., 2016

1.1.3 Manifestações clínicas

A maioria das infecções por qualquer sorotipo do DENV são assintomáticas. Sabe-se pouco sobre os determinantes (seja do hospedeiro, virais, dentre outros) para que uma infecção por DENV seja assintomática ao invés de sintomática. Por definição, as infecções assintomáticas não são detectadas/diagnosticadas na vigilância de rotina e só podem ser analisadas no contexto de inquéritos soropidemiológicos e estudos prospectivos/retrospectivos de coortes. Estudos com diferentes coortes indicam uma porcentagem de assintomáticos que varia de 42% até 94% dos casos (8, 13, 14). Essa variação se dá pelas diferenças

de cada população analisada, principalmente se residem em locais endêmicos e também de seu histórico de infecções por outros flavivírus. A estimativa divulgada pela OMS (Organização Mundial de Saúde) em 2013 indicou que em média 390 milhões de infecções por DENV ocorrem todos os anos, das quais somente 96 milhões se manifestam clinicamente, levando a uma proporção de 1 caso de doença sintomática para cada 3 assintomáticos, indicando uma média de 75% de casos assintomáticos anualmente (14).

Em casos sintomáticos, o DENV pode causar doença cujo espectro inclui desde formas oligossintomáticas, com febre indeterminada e autolimitada, até quadros graves com choque com ou sem hemorragia, podendo evoluir para o óbito (15). Em 2009 a OMS propôs a classificação para casos de dengue utilizada atualmente, a qual é dividida em: dengue com ou sem sinais de alerta e dengue grave.

A doença pode apresentar três fases: febril, de recuperação e crítica. Após o período de incubação intrínseca, ocorre a fase febril, na qual os pacientes desenvolvem febre alta repentina (39 a 40°C) que pode durar de 2 a 7 dias, geralmente acompanhada por um ou mais sintomas como: dor de cabeça, mialgia, artralgia, prostração, fraqueza, dor retro orbital, perda de peso, náuseas e vômitos, erupção e prurido cutâneo. Nessa fase febril inicial da doença pode ser difícil diferenciá-la de outras doenças febris (16, 17).

No período de diminuição ou desaparecimento da febre, geralmente entre o 3º e 7º dia da doença, alguns casos irão evoluir para a recuperação e cura (considerados dengue sem sinais de alerta) e outros podem apresentar sinais de alerta e evoluir para a fase crítica com formas graves da doença. Os sinais de alerta incluem: dor abdominal intensa e contínua, ou dor a palpação do abdômen, vômitos persistentes, acúmulo de líquidos (ascites, derrame pleural, pericárdico), sangramento de mucosas, letargia ou irritabilidade, hipotensão postural (lipotímia), hepatomegalia e aumento progressivo do hematócrito. A dengue grave é definida por um ou mais dos seguintes quadros: choque de extravasamento de plasma, acúmulo de líquido com desconforto respiratório, ou ambos; hemorragia grave avaliada pelo médico ou comprometimento severo (insuficiência) de órgãos como fígado, coração, dentre outros.

Estudos indicam que infecções secundárias apresentam maior número de casos com maior severidade quando comparadas à infecções primárias, terciárias e

quaternárias, que geralmente são infecções com sintomas leves ou assintomáticas (18, 19).

Não se sabe muito sobre a razão dessa diferença entre a severidade das infecções, já que a resposta a infecção pelo DENV depende de diversos fatores como: estado imunológico do hospedeiro, idade, tempo entre infecções, sorotipos e genótipos infectantes, dentre outros (12).

Há diversas hipóteses sobre este tema na literatura, mas uma das mais discutidas é a de que infecções secundárias seriam mais graves em comparação a infecções primárias devido a um fenômeno chamado ADE (Antibody-Dependent Enhancement). Esse fenômeno ocorreria porque em uma infecção primária o indivíduo produz anticorpos neutralizantes contra o sorotipo homólogo responsável pela infecção e também anticorpos não-neutralizantes que conferem imunidade temporária contra sorotipos heterólogos de DENV. Então, em uma infecção secundária, esses anticorpos não-neutralizantes permitiriam e aumentariam a entrada do DENV em células hospedeiras e, potencialmente, exacerbariam a doença devido à maior produção viral (18-20).

Estudos sugerem também que o intervalo entre a primeira e segunda infecção por DENV e o sorotipo e genótipo causador de cada uma podem ser importantes determinantes da gravidade da doença. Foi observado que quanto maior o tempo entre as exposições maior a chance de desenvolver dengue grave e também que a ordem dos sorotipos pelo qual um indivíduo foi infectado pode influenciar no desfecho da doença (21-23).

A idade do indivíduo também parece estar associada à gravidade da doença, já que indivíduos mais jovens geralmente apresentam taxas mais altas de infecções não-primárias graves (23).

Não existe tratamento antiviral contra o DENV, apenas tratamentos para os sintomas da doença. Atualmente há somente uma vacina tetravalente disponível e liberada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para comercialização no país, a Dengvaxia®, desenvolvida pela Sanofi Pasteur. A mesma é indicada a indivíduos de 9 a 45 anos que já tenham tido a doença comprovada por meio de exames sorológicos (24-26). Portanto, o único meio comprovadamente eficaz e permanente para prevenção da doença na população geral é o controle do vetor (15, 17).

1.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da dengue é importante tanto para o manejo clínico quanto para a vigilância e pesquisa. Um fator importante a ser considerado é o atual cenário epidemiológico no Brasil que tornou o diagnóstico clínico e laboratorial da dengue um desafio ainda maior, isso porque desde os anos de 2014-2015 há cocirculação dos arbovírus ZIKV (Zika vírus), CHIK (Chikungunya vírus) e dos DENV 1-4 em diversos municípios do país (27). Esses arbovírus têm em comum não só sua forma de transmissão pelo vetor *Aedes aegypti* (28), mas também sintomatologias muito semelhantes quando as doenças estão em fase inicial (Tabela 1 e Tabela 2), o que dificulta a caracterização, diagnóstico e manejo clínico destes pacientes, além de dificultar também a vigilância e inquéritos soropidemiológicos das doenças (29).

Tabela 1- Diferenças dos sintomas clínicos e laboratoriais da dengue e chikungunya

Manifestação clínica/laboratorial	Dengue	Chikungunya
Intensidade da febre	++	+++
Exantema	+ (D5-D7)	++ (D1-D4)
Mialgia	++	+
Artralgia	+/-	+++
Dor retroorbital	+++	+
Sangramentos	++	-/+
Choque	-/+	-
Plaquetopenia	+++	+
Leucopenia	+++	++
Linfopenia	++	+++
Neutropenia	+++	+
Evolução após fase aguda	Fadiga	Artralgia crônica

Fonte: (STAPLES et al., 2009 apud BRASIL, 2015, adaptado).

+++ = 70-100% dos pacientes; ++ = 40-69%; + = 10-39%; +/- = <10%; - = 0%.

Fonte: Brasil. Ministério da Saúde, 2016

Tabela 2 – Diferenças dos sintomas clínicos e laboratoriais da dengue e zika.

Manifestação clínica/laboratorial	Dengue	Zika
Intensidade da febre	++	+ /ausente
Exantema	+(D5-D7)	++++ (D2–D3)
Mialgia	++	+
Artralgia	+/-	+
Dor retrorbital	+++	++
Conjuntivites	-/+	+++
Sangramentos	++	-
Choque	-/+	-
Leucopenia/trombocitopenia	+++	-

Fonte: (STAPLES et al., 2009 apud BRASIL, 2015, adaptado; HALSTEAD et al., 1969 apud INSTITUTE DE VEILLE SANITAIRE, 2014).

Fonte: Brasil. Ministério da Saúde, 2016

Podemos observar nas tabelas acima (Tabela 1 e Tabela 2) que somente a análise da sintomatologia e exames hematológicos do paciente pode levar a um diagnóstico errôneo destas arboviroses, portanto, para um diagnóstico diferencial e definitivo devem ser utilizados testes laboratoriais que detectem anticorpos específicos do hospedeiro, antígenos virais, o próprio vírus ou seu genoma. A indicação de cada teste laboratorial depende principalmente da fase e tempo após a infecção em que o indivíduo se encontra e o período no qual a amostra foi coletada (Tabela 3) (30).

Tabela 3 - Testes para diagnóstico diferencial da dengue

Objetivo	Teste indicado	Dias de doença	
		< 5 dias	≥ 5 dias
Diagnóstico de infecção aguda	RT-PCR; Real time RT-PCR	X	
	Deteção de NS1	X	
	Isolamento e identificação viral	X	
	Sorologia: Deteção de IgM anti-DENV em única amostra		X
	Soroconversão de IgG anti-DENV por teste de inibição da hemaglutinação (IH) ou ELISA em amostras pareadas	X	X
Vigilância epidemiológica	Vigilância sorológica (deteção de IgM anti-DENV)		X
	Vigilância molecular e virológica	X	
Inquérito soropidemiológico	ELISA IgG, Ensaios de neutralização		Amostra Pós-convalescência

Fonte: Adaptado de Guzman e Harris, 2015

1.1.4.1 Métodos sorológicos

Os métodos sorológicos podem ser utilizados para a realização do diagnóstico diferencial da dengue de outras infecções, determinando de acordo com a dinâmica dos marcadores sorológicos, se uma infecção aguda sintomática é primária ou não-primária e também na realização de inquéritos soroepidemiológicos para pacientes assintomáticos. Os testes mais realizados na rotina para diagnóstico de uma infecção aguda/recente por dengue são os testes para detecção da proteína viral NS1 e/ou detecção de IgM (Imunoglobulina M) anti-DENV e, para determinar se houve exposição prévia ao DENV é utilizada a detecção de IgG (Imunoglobulina G) anti-DENV (11, 31).

A proteína viral não-estrutural NS1 é uma glicoproteína altamente conservada, presente em altas concentrações no soro de pacientes infectados pelo DENV. Pode ser detectada desde o 1º dia até o 9º dia de doença, com pico entre 3 e 5 dias (32) nas formas primárias e não-primárias de infecção (33), podendo ser encontrada também em amostras teciduais (34). Os métodos mais utilizados para detecção desse antígeno são a imunocromatografia (chamado de teste rápido, combinado ou não com a detecção de IgM/IgG anti-DENV) ou a captura de antígeno por meio de ELISA (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ou ensaio de imunoabsorção enzimática), sendo este mais sensível e específico do que a imunocromatografia. O pico dos títulos de NS1 ocorre em média no terceiro dia de doença, com declínio progressivo após a produção de anticorpos e eventual neutralização do antígeno, portanto, estes testes devem ser realizados em amostras de soro coletadas durante a fase febril/aguda (31).

Estudos apontam que a especificidade de alguns testes para detecção de NS1 pode chegar até 100% (90-100%), já a sensibilidade varia de 34% a 89,6%, de acordo com o dia em que amostra foi coletada e a região geográfica onde o paciente reside, já que em regiões endêmicas a maioria da população já foi exposta ao DENV (35-39). Outros fatores que podem interferir na sensibilidade é o sorotipo viral e o estado sorológico do paciente (dengue primária ou não-primária). Em geral, a taxa de detecção de NS1 é maior em pacientes com dengue primária do que naqueles com dengue não-primária, isso ocorre provavelmente pela neutralização do antígeno quando há níveis maiores de IgG presentes (38-42).

De acordo com as diretrizes da Organização Pan-Americana de Saúde (PAHO), 80% de todos os casos de dengue têm anticorpos IgM anti-DENV detectáveis a partir do 5º dia de doença e 93% a 99% dos casos a partir do 6º até 10º dia em infecções primárias e podem permanecer detectáveis durante mais de 90 dias (em média 2 a 3 meses, podendo chegar a mais de 6 meses), sendo que sua duração e persistência não difere entre indivíduos sintomáticos e assintomáticos (43). Em infecções não-primárias essa dinâmica é diferente, os anticorpos IgM podem ser produzidos em níveis muito baixos e indetectáveis ou nem serem produzidos (44). A detecção de IgM anti-DENV é o teste mais utilizado em vigilância e diagnóstico laboratorial e deve ser realizado em amostras convalescentes (colhidas em média após o 6º dia de doença) por meio de testes de imunocromatografia ou diferentes formatos de ELISA, sendo o mais utilizado o MAC-ELISA, que possuem diferentes graus de sensibilidade e especificidade. Um estudo que avaliou a sensibilidade e especificidade de diversos testes comerciais por imunocromatografia e por ELISA encontrou uma variabilidade de 20,5% a 97,7% de sensibilidade e de 76,6%–90,6% na especificidade de testes rápidos e, para os testes de ELISA a sensibilidade variou de 61,5% a 99,0% e a especificidade de 79,9% a 97,8% (31, 45).

Estes testes são úteis para a vigilância e o diagnóstico de suporte da infecção por DENV somente quando analisados em conjunto com sintomas clínicos, histórico médico, resultados de outros testes específicos e outras informações epidemiológicas. Já que o IgM anti-DENV pode persistir por até mais de 60 dias, a presença deste marcador indica somente que uma infecção recente por dengue ocorreu nos últimos 2-3 meses, portanto, estes testes não devem ser usados isoladamente como testes confirmatórios, principalmente em países endêmicos para dengue (11, 43). A principal limitação dos testes de detecção de IgM anti-DENV é sua potencial reatividade cruzada com outros agentes infecciosos ou doenças autoimunes, como por exemplo: malária, leptospirose, fator reumatóide e outros flavivírus (*West Nile virus* (WNV), *St. Louis encephalitis virus* (SLE), *Japanese Encephalitis virus* (JEV), *Yellow Fever virus* (YFV), dentre outros (45, 46).

Já a resposta IgG é detectada em baixos títulos de 8 a 10 dias após o início dos sintomas na infecção primária e dura o resto da vida do indivíduo. A infecção primária por um sorotipo de DENV confere imunidade protetora definitiva em relação ao sorotipo homólogo, mas não confere mais que uma proteção parcial e temporária contra os outros sorotipos em caso de reinfecção. Nas infecções não-primárias os

anticorpos IgG já estão presentes logo após o início dos sintomas e são detectados em níveis maiores do que em infecções primárias (11, 30).

Os testes de detecção de IgG anti-DENV para diagnóstico de exposição prévia ao DENV mais utilizados são imunocromatografia e ELISA. Assim como no caso dos testes de ELISA para NS1 e IgM anti-DENV, os testes de ELISA para IgG anti-DENV são mais específicos e sensíveis que os de imunocromatografia, com uma sensibilidade que pode variar de 23,4% a 99,7% e especificidade de 93% a 100% em kits comerciais, de acordo com seus fabricantes (31).

O ensaio de neutralização por redução de placa (PRNT, do inglês *Plaque Reduction Neutralization Test*) também é uma opção para o diagnóstico de exposição ao DENV. Este teste possibilita a detecção e quantificação de anticorpos neutralizantes e a identificação do sorotipo infectante, sendo mais específico e sensível que outros métodos sorológicos e tido como *Gold Standard* (padrão ouro). Atualmente, o PRNT é utilizado principalmente para definir a imunogenicidade de candidatos a vacina contra dengue, estudos soropidemiológicos e estudos de patogênese da doença (infecção primária x não-primária). As desvantagens para utilização deste método é que ele é trabalhoso e demorado, requer pessoal treinado e há grandes chances de contaminação com reação cruzada e resultados falso-positivos (11, 47).

Em geral os métodos sorológicos são mais baratos, rápidos, de fácil realização e fácil acesso (existem diversos testes comerciais disponíveis), quando comparados com técnicas como o isolamento viral ou detecção de ácidos nucleicos. Porém, possuem limitações como sua sensibilidade e especificidade. Há relatos de baixa sensibilidade de NS1 em epidemias e, quanto a detecção de IgM e IgG anti-DENV, já foram descritas reações cruzadas com outros agentes infecciosos, principalmente com outros flavivírus. Um dos flavivírus de maior importância clínica que circulam no país é o ZKV, relacionado a casos graves de malformações congênitas e da síndrome de Guillain-Barré (SGB). Em 2015, esse vírus foi introduzido na região nordeste e se espalhou para diversas regiões do país causando grandes epidemias. Vários trabalhos descrevem a reação-cruzada de marcadores sorológicos para DENV e ZKV, com relatos de cruzamento de 100% em kits de IgG anti-DENV quando testados em amostras ZKV IgG positivas. Esse dado mostra a grande dificuldade de um diagnóstico diferencial correto em casos de infecções por estes

flavivírus no país, o que torna um desafio a obtenção de dados epidemiológicos para vigilância destas doenças (45, 46, 48, 49).

Portanto, não é recomendado o diagnóstico de uma infecção por DENV, seja aguda/recente ou prévia, baseado somente em testes sorológicos, especialmente em locais endêmicos para dengue e que possuam circulação simultânea de outros flavivírus, como é o caso do Brasil (12). Além disso, os métodos sorológicos são incapazes de detectar a infecção durante o período de janela imunológica (tempo entre a infecção e o aparecimento dos marcadores sorológicos) (11, 31).

1.1.4.2 Métodos moleculares

Os métodos moleculares têm por objetivo a detecção do genoma viral em diversos tipos de amostras clínicas de humanos (soro, plasma, tecido, dentre outras) e também de mosquitos. São mais específicos, sensíveis e confiáveis para o diagnóstico da infecção por DENV e sua diferenciação de infecção por outros agentes, podendo também ser utilizados para determinação do sorotipo, genótipo e carga viral. Porém, estes métodos devem ser utilizados durante o período de viremia, sendo inúteis após a fase aguda da doença (11, 31).

As principais técnicas utilizadas são baseadas no método de PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase), e consistem na amplificação do material genético viral in-vitro. Os exemplos das técnicas mais utilizadas para detecção do DENV são:

- **Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR):** a reação de PCR por transcrição reversa consiste na detecção qualitativa ou quantitativa (dependendo da técnica utilizada para detecção) de RNA viral presente na amostra através da síntese de um DNA complementar (cDNA) a partir do RNA alvo pela enzima RT (*Reverse Transcriptase*). Após esta etapa, o cDNA é amplificado como em uma PCR convencional e sua detecção pode ser feita através de eletroforese em gel de agarose ou por qPCR (50).
- **Real-time polymerase chain reaction (qPCR):** O PCR em tempo real pode ser utilizado para finalidades qualitativas (ex.: detecção viral e sorotipagem) ou

quantitativas (ex.: carga viral) e por diversos protocolos. Para realização da detecção do RNA de DENV, o método mais utilizado é a combinação do RT-PCR com o qPCR (RT-qPCR), no qual o RNA presente na amostra é transformado em cDNA pela enzima RT e amplificado. Podem ser utilizados dois protocolos: *One-Step*, onde toda a reação de síntese de cDNA e amplificação por PCR ocorre num único tubo ou *Two-Steps*, que requer que a reação de transcriptase reversa e amplificação por PCR sejam realizadas separadamente. Para detecção destes produtos de PCR os sistemas fluorescentes mais utilizados são o SYBR Green e o TaqMan. O SYBR Green não é específico, pois liga-se ao DNA de cadeia dupla dos produtos de PCR e emite luz após excitação, que aumenta de acordo com a quantidade de produtos gerados. Já as sondas do sistema TaqMan são desenhadas de acordo com a sequência específica a qual deseja-se detectar, sendo assim, também permitem a detecção simultânea de diversos produtos de PCR em um único tubo. Isto é possível porque cada um dos diferentes corantes fluorescentes pode ser associado a uma sonda diferente com um espectro de emissão específico (51).

- ***Transcription-Mediated Amplification (TMA)***: consiste em um sistema que usa duas enzimas para conduzir a reação: RNA polimerase e transcriptase reversa (RT). É uma reação isotérmica, a qual é realizada em um único tubo e a uma temperatura constante (banho-maria ou termobloco) e que pode amplificar DNA ou RNA, e produzir amplicon de RNA, em contraste com a maioria dos outros métodos de amplificação de ácido nucleico, que produzem apenas DNA (50).

Há diversos protocolos disponíveis na literatura para detecção genérica ou específica do DENV e seus sorotipos (52, 53) e também protocolos para detecção do DENV em conjunto com outros arbovírus (54). Além disso, técnicas de sequenciamento por métodos de Sanger ou de nova geração (NGS) podem ser utilizadas para análise de genótipos e mutações virais, importantes para diversos estudos de caracterização viral.

A principal vantagem da utilização dos métodos moleculares é a capacidade de detectar o RNA viral durante todo o período de viremia do paciente,

até mesmo quando o mesmo encontra-se assintomático, seja por estar no período de incubação intrínseca ou por ser naquele indivíduo uma infecção absolutamente assintomática, tornando o diagnóstico mais preciso e eliminando o problema da janela imunológica, quando os métodos sorológicos são incapazes de detectar a infecção (55). Estes métodos são também rápidos, sensíveis, simples e reprodutíveis, e podem ser realizados em diversos tipos de amostras, porém, para sua realização é necessária uma infraestrutura e equipamentos especiais, assim como pessoal capacitado para interpretação dos resultados, portanto podem custar mais quando comparados aos métodos sorológicos (11, 31).

1.1.4.3 Isolamento e identificação viral

O isolamento viral ainda é uma técnica utilizada para detecção e identificação do sorotipo viral e deve ser realizada em amostras colhidas durante o período de viremia. Pode ser feita por inoculação intracerebral em camundongos, culturas de células de mamíferos (LLC-MK2), inoculação intratorácica de mosquitos adultos e uso de culturas de mosquitos (Ex.: C6/36), sendo a linhagem celular de mosquito *Aedes albopictus* C6 / 36 o sistema mais utilizado para diagnóstico de rotina. O isolamento viral pode ser tão sensível quanto as técnicas moleculares, mas há diversas dificuldades em sua realização: necessidade de pessoal especializado, técnica demorada e trabalhosa, problemas no manuseio, armazenamento e a presença de anticorpos e contaminações que podem influenciar o resultado (11, 31).

1.1.5 Epidemiologia

A dengue é a arbovirose que se espalha mais rapidamente no mundo e representa um importante problema de saúde pública internacional. É endêmica em mais de 100 países na Ásia, Pacífico, Américas, África e no Caribe. Cerca de 2,5 bilhões de pessoas, ou 40% da população mundial, vivem em áreas onde há um risco de transmissão da doença. A OMS estima que 50 a 100 milhões de infecções ocorram anualmente, incluindo 500.000 casos de dengue grave e 22.000 mortes, principalmente entre as crianças (14, 56).

A incidência da doença cresceu drasticamente em todo o mundo nas últimas décadas e um estudo recente sugere que infecções por dengue são em sua maioria subnotificadas ou erroneamente classificadas, e as taxas de infecção anual podem ser até três a quatro vezes maior do que o estimado pela OMS (14). Um estudo realizado no Brasil observou que durante a epidemia a cada 20 casos sintomáticos somente 1 é notificado e que em períodos de baixa transmissão essa razão sobe para 40 casos para 1 notificação (57).

1.1.5.1 Histórico da dengue no Brasil

No Brasil, na década de 50, após 50 anos de intensos esforços, o Brasil foi certificado como tendo erradicado o *Aedes aegypti* de seu território. No entanto, 10 anos depois o mosquito voltou a ser encontrado nas cidades de Belém e Salvador e, na década de 80, disseminou-se pelo estado do Rio de Janeiro (58, 59). A existência do vetor, o clima tropical e a abundância de chuvas, somado ao ambiente urbano deteriorado com acúmulo de lixo e água parada propiciam o ambiente ideal para a propagação do mosquito, desencadeando diversas epidemias da doença. A ocorrência de epidemia de dengue nas diferentes regiões do país é de certa forma imprevisível e, essa imprevisibilidade decorre do conhecimento ainda incompleto da doença e também da efetividade do controle do vetor em cada local. Após a reintrodução do vetor, o número de casos da doença foi aumentando ano a ano, assim como a área de ocorrência dos mesmos (60, 61).

A primeira epidemia documentada clínica e laboratorialmente ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista (RR), causada pelos sorotipos DENV-1 e DENV-4 (62). No ano de 1986, com a introdução do DENV-1 no Rio de Janeiro, foram registradas epidemias em diversos estados (63). A introdução dos sorotipos DENV-2 e DENV-3 ocorreu também pelo Rio de Janeiro, em 1990 (64) e 2000 (65), respectivamente. O DENV-3 apresentou rápida dispersão para 24 estados do país no período de 2001-2003. O DENV-4 foi reintroduzido no país em 2010 no estado de Roraima (66), dali se espalhou para o resto do país, sendo o grande responsável pela epidemia da doença no ano de 2013 (67-69).

Após um ano com diminuição de casos em 2012, com 589.591 casos de dengue em todo o Brasil, o Ministério da Saúde apontou um aumento expressivo no

ano de 2013, com 1.452.489 casos da doença, causados em sua grande maioria pelo sorotipo DENV-4 onde, somente na região Sudeste, foram registrados 918.226 casos (70, 71).

Em 2014, o Brasil começou a adotar a nova classificação de casos de dengue da OMS e, por essa razão não é possível à comparação direta dos casos graves com o ano de 2013, tendo em vista que anteriormente adotavam-se as seguintes classificações: febre hemorrágica da dengue (FHD), síndrome do choque da dengue (SCD) e dengue com complicações (DCC) (70).

De acordo com as novas regras, o Ministério da Saúde registrou 591.080 casos prováveis (casos notificados, incluindo todas as classificações, exceto descartados) de dengue no país até a semana epidemiológica (SE) 53 (28/01/14 a 03/01/15) em 2014. A Região Sudeste teve o maior número de casos prováveis (312.318 casos; 52,8%) em relação ao total do país, seguida das regiões Centro-Oeste (114.814 casos; 19,4%), Nordeste (90.192 casos; 15,3%), Norte (49.534 casos; 8,4%) e Sul (24.222 casos; 4,1%), dados que representam uma redução de 59,3% dos casos no país em relação à epidemia de 2013 (70).

Destes casos prováveis, 689 casos de dengue grave e 8.150 casos com sinais de alarme foram confirmados, sendo que a maioria destes foram registrados na região Sudeste (285 graves; 6.042 com sinais de alarme). Houveram 410 óbitos confirmados neste ano, o que representa uma redução no país de 39,0% em comparação com o mesmo período de 2013, quando foram confirmados 674 óbitos. As proporções dos sorotipos virais identificados foram: DENV-1 (82%), DENV-4 (16,1%), DENV-2 (1,5%) e DENV-3 (0,5%) (70).

Em 2015 os números voltaram a disparar. Até a SE 52 (04/01/15 a 02/01/16) foram registrados 1.688.688 casos prováveis de dengue no país, com 1.714 casos de dengue grave e 21.693 casos de dengue com sinais de alarme confirmados. A região que registrou o maior número de casos prováveis em relação ao total do país foi novamente a Sudeste (1.026.226 casos; 62,2%), seguida das regiões Nordeste (311.519 casos; 18,9%), Centro-Oeste (220.966 casos; 13,4%), Sul (56.187 casos; 3,4%) e Norte (34.110 casos; 2,1%) (72)

A região Sudeste também concentrou o maior número de registros de casos de dengue grave e dengue com sinais de alarme, com 65,2% dos óbitos do país, onde o maior número de óbitos registrados foi no estado de São Paulo. Também foram confirmados 863 óbitos por dengue, o que representa um aumento no país de

82,5% em comparação com o mesmo período de 2014. As proporções dos sorotipos virais identificados foram: DENV-1 (93,8%), DENV-4 (5,1%), DENV-2 (0,7%) e DENV-3 (0,4%) (72).

No ano de 2016, até a SE 52 (3/1/2016 a 31/12/2016), foram registrados 1.500.535 casos prováveis de dengue no país, com uma incidência de 733,4 casos/100 mil hab. Novamente a região Sudeste foi a que registrou o maior número de casos prováveis (858.273 casos; 57,2%), seguida das regiões Nordeste (324.815 casos; 21,6%), Centro-Oeste (205.786 casos; 13,7%), Sul (72.650 casos; 4,8%) e Norte (39.011 casos; 2,6%). As regiões Centro-Oeste e Sudeste também apresentaram as maiores taxas de incidência: 1.322,0 casos/100 mil hab. e 1.001,2 casos/100 mil hab., respectivamente. Foram confirmados 885 casos de dengue grave e 8.603 casos de dengue com sinais de alarme e 642 óbitos por dengue. Ainda há 401 casos de dengue grave ou dengue com sinais de alarme e 567 óbitos em investigação. Neste ano o sorotipo predominante continuou sendo o DENV-1 como nos anos anteriores (73).

Em 2017, foram registrados 239.389 casos prováveis de dengue no país, com uma incidência de 114,8 casos/100 mil hab. Neste ano, diferentemente dos anos anteriores, a região Nordeste apresentou o maior número de casos prováveis (83.602 casos) seguida pelas regiões Centro-Oeste (78.963 casos), Sudeste (52.667 casos), Norte (21.638 casos) e Sul (2.519 casos). A região Sudeste também deixou de ter uma das maiores incidências já que as regiões com as maiores taxas foram a Centro-Oeste (490,9 casos/100 mil hab.) e Nordeste (147,3 casos/100 mil hab.). Até o momento foram confirmados 293 casos de dengue grave e 2.709 casos de dengue com sinais de alarme e 185 óbitos, onde a região Centro-Oeste apresentou o maior número de casos confirmados de dengue grave (128 casos) e de dengue com sinais de alarme (1.939 casos). Neste ano o sorotipo predominante foi o DENV-2 seguido do DENV-1, DENV-4 e DENV-3, diferentemente dos anos anteriores nos quais o sorotipo DENV-1 foi o predominante (74).

No ano de 2018, foram registrados 265.934 casos prováveis de dengue no país, com uma incidência de 127,5 casos/100 mil hab. Neste ano a região Centro-oeste registrou o maior número de casos 102.284 casos com uma alta incidência de 635,9 casos/100 mil hab., seguida pela região Sudeste que apresentou um aumento no número de casos, registrando 75.421 casos com incidência de 86,0/100 mil hab. Houve um aumento casos de dengue com sinais de alerta 3.616 e 321 casos graves

e 155 óbito. O sorotipo predominante foi o DENV-2 (52,4%), seguido do DENV-1 (23,9%), DENV-4 (0,4%) e DENV-3 (0,1%) (75).

1.2 BANCO DE SANGUE

No Brasil toda atividade e serviço de hemoterapia, seja público ou privado, é regulamentada pelo Ministério da Saúde de acordo com os princípios e diretrizes da Política Nacional de Sangue, Componentes e Derivados e visa principalmente garantir a segurança relativa à coleta, processamento, estocagem, distribuição e aplicação do sangue, seus componentes e derivados. Além de respeitar todas as normas técnicas e portarias, os serviços de hemoterapia devem respeitar também os requisitos sanitários para funcionamento definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Diversos fatores influenciam na segurança de uma transfusão de hemocomponentes, como: o perfil epidemiológico da população, a seleção dos candidatos pelas triagens hematológica e clínica, a eficácia dos testes moleculares e sorológicos em detectar agentes transmissíveis pelo sangue, dentre outros. Devido as regulamentações existentes, a doação de sangue no país é estritamente anônima, voluntária, altruísta e não pode ser remunerada direta ou indiretamente (76).

As doações de sangue são classificadas em autóloga (quando destinada ao próprio doador) ou alogênica (quando destinada à pessoa que não o próprio doador). Em relação às doações alogênicas, as mesmas podem ser classificadas como: espontâneas: realizada sem vínculo a um receptor/paciente, somente para manutenção dos estoques de hemocomponentes ou de reposição: realizada para repor ou atender a necessidade de um receptor/paciente específico, repondo os estoques dos serviços sendo motivados pelo próprio serviço ou por pessoas ligadas aos receptores. Quanto ao doador, ele pode ser classificado em: doador de 1ª vez: doa pela primeira vez no serviço; doador de repetição: doa duas ou mais vezes em 12 meses; doador esporádico: doa novamente após intervalo superior a 12 meses (76).

O processo sistemático que compreende os acontecimentos entre a captação dos doadores e a transfusão adequada de hemocomponentes nos receptores e hemovigilância é chamado de ciclo do sangue, exemplificado na Figura 4.

Figura 4 – Ciclo do sangue
Fonte: autoria própria, 2019

O candidato à doação ao se apresentar ao serviço de hemoterapia deve preencher os requisitos estabelecidos pelo Ministério da Saúde (Portaria nº 158 de 04 de fevereiro de 2016), sempre visando a proteção do doador e receptor e a qualidade dos produtos. O candidato deve ter idade entre 16 anos completos (necessário consentimento formal, por escrito, do responsável legal) e 69 anos, 11 meses e 29 dias, sendo que o limite de idade para a primeira doação é de 60 anos. Para indivíduos acima de 70 anos e abaixo de 16 anos de idade completos, é necessária a avaliação dos riscos e benefícios e justificativa médica da necessidade da doação (76).

O intervalo mínimo entre doações de sangue total é de 2 meses para homens e de 3 meses para mulheres, e a frequência máxima admitida entre as doações é de 4 doações anuais para o homem e de 3 doações anuais para a mulher, exceto em circunstâncias especiais que devem ser avaliadas e aprovadas pelo médico responsável (76).

Após um cadastro o candidato é encaminhado à pré-triagem (ou triagem hematológica) etapa na qual são aferidos seus sinais vitais (pressão arterial, pulso e temperatura), o peso e a altura e dosados sua hemoglobina e/ou hematócrito, após essa etapa o doador é encaminhado para a triagem clínica onde passará por uma avaliação clínica e epidemiológica respondendo a um questionário confidencial e sendo entrevistado em um ambiente privativo por um profissional de saúde sobre sua história médica atual e prévia, seus hábitos e fatores de risco para doenças transmissíveis pelo sangue, sempre enfatizando que o candidato responda com honestidade para garantir a segurança dos receptores e, ao final é solicitado que o candidato assine um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), no qual o mesmo declara ter recebido todas as informações necessárias, ter tido todas suas dúvidas esclarecidas e que concorda em doar seu sangue para uso pelo serviço após os testes preconizados pelas normas (76).

Essas etapas de triagens são muito importantes, pois são elas que determinam se um candidato está apto à doação ou não, determinando se o mesmo está em boas condições de saúde para doar seu sangue sem que haja complicações para si próprio garantindo assim sua segurança e, visam também proteger os receptores, garantindo que o candidato não é portador de doenças que poderiam ser transmitidas via transfusão. Em caso de inaptidão temporária, definitiva ou por tempo indeterminado, o candidato deve ser comunicado e ter a razão do indeferimento

explicada. O candidato considerado apto após esse processo é encaminhado à coleta (76).

1.2.1 Coleta, processamento e armazenamento

Todo material utilizado para coleta é descartável, estéril, apirogênico e de uso único. As bolsas utilizadas são sistemas fechados e podem ser simples, duplas, triplas ou quádruplas, sendo que a escolha depende dos hemocomponentes que se deseja obter a partir da bolsa coletada (Figura 5). A maioria das bolsas contém um dispositivo (bolsa acessória) que permite o desvio e reserva dos primeiros 30-45 mL de sangue para preenchimento dos tubos de amostras que serão encaminhados para análise. Esse dispositivo também reduz a chance de bactérias da pele adentrarem a bolsa de sangue e evita que a rolha de pele desprendida na punção se desloque para o interior da bolsa de sangue (76).

Figura 5 - Esquemas dos sistemas de bolsas duplo, triplo e quádruplo.

Fonte: JPFARMA website (disponível em: <http://www.jpfarma.com.br/produtos/tecnologia-em-transfusao-e-biotecnologia/bolsas-standard/>)

O procedimento de coleta deve sempre ser realizado por profissionais treinados e sob rigorosas condições de antissepsia para minimizar o risco de contaminação do material coletado e evitar complicações ao receptor (hematomas, injúria nervosa, dentre outros). Todas as bolsas e tubos devem ser identificadas com o número de identificação do doador e o tempo médio de coleta é de 12 minutos e o máximo 15 minutos, onde geralmente são coletados 450 ± 45 mL de sangue total, esta quantidade depende do volume de solução anticoagulante/preservante presente na bolsa. Bolsas com 300-405 mL de sangue total são classificadas como unidades de baixo volume e só o concentrado de hemácias pode ser utilizado (76).

Ao final da doação as amostras são enviadas ao laboratório e as bolsas são transportadas, em condições adequadas, para o setor de processamento. O doador deve ser mantido em observação por alguns minutos e ser liberado se estiver sem quaisquer sintomas. Deve também ser orientado para que faça um lanche no serviço, aumente sua ingestão líquida e se preserve naquele dia, evitando atividades físicas intensas ou que possam colocar em risco sua vida e a de outras pessoas. Após a doação o doador preenche de maneira confidencial um termo de auto exclusão no qual o mesmo pode pedir o descarte de sua bolsa caso perceba que tenha omitido algum fator de risco importante durante a triagem clínica, visando mais uma vez a segurança transfusional (76).

A coleta também pode ser feita por meio de aférese, que consiste em uma separação e coleta seletiva de hemocomponentes, podendo ser realizada para obtenção de hemácias, plaquetas, plasma e concentrados de granulócitos (CG - suspensões de granulócitos em plasma) (76).

A bolsa de sangue total é processada em sistema fechado, estéril e apirogênico dando origem aos hemocomponentes eritrocitários, plasmáticos e plaquetários. Os componentes eritrocitários são os concentrados de hemácias (CH). Entre os componentes plasmáticos estão o plasma fresco congelado (PFC), o plasma fresco congelado em 24 horas (PFC24) e o plasma comum (PC), a diferença entre sua obtenção é o tempo entre a coleta e o congelamento e propriedades diferentes quanto aos fatores de coagulação presentes. Também podem ser obtidos a partir destes hemocomponentes o crioprecipitado (obtido do PFC) e o plasma isento de crioprecipitado (PIC). Já o concentrado de plaquetas (CP) é geralmente obtido a partir do plasma rico em plaquetas. Esses hemocomponentes podem ser modificados para

atender necessidades especiais de alguns receptores, por processos de leucorredução/filtração, lavagem ou irradiação (76).

Todos os hemocomponentes obtidos por aférese ou após o processamento das bolsas de sangue total são colocados em quarentena, o que significa que são armazenados temporariamente até que os resultados dos testes imuno-hematológicos, sorológicos e de biologia molecular sejam liberados (76)

Cada hemocomponente tem sua temperatura ótima de conservação para manutenção de sua qualidade e função. Os CH são armazenados a uma temperatura de $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com validade variando do conservante utilizado na coleta, sendo de 21 dias (coletado em ACD ou CPD), 35 dias (coletado em CPDA-1) e 42 dias (com solução aditiva SAG-manitol) e podem ter validade de até 10 anos se forem congelados. Os CP devem ser armazenados em temperatura ambiente de $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$ e sob agitação contínua leve e têm validade de 3 ou 5 dias dependendo do plastificante da bolsa. Os produtos plasmáticos devem ser mantidos congelados a temperaturas inferiores a -20°C tendo validade de 12 meses a partir da data da coleta. Se mantidos a temperaturas inferiores a -30°C o PFC e o PFC24 têm validade de 24 meses. O CG são armazenados entre 20°C e 24°C e têm validade de 24 horas a partir da coleta. A leucorredução não altera a validade do CP e do CH, já a irradiação não altera a validade original do CP, mas após irradiação do CH a validade do mesmo passa para 28 dias a partir da irradiação, respeitando a validade original do CH (76).

1.2.2 Exames laboratoriais do doador

Segundo a portaria nº 158 de 04 de fevereiro de 2016 é obrigatória a cada doação a realização de exames imuno-hematológicos do doador: tipagem ABO e RhD e pesquisa de anticorpos antieritrocitários irregulares (PAI). A pesquisa de hemoglobina S (relacionada a doença falciforme) também é obrigatória e, se obtido um resultado positivo, o uso do CH é restringido somente a alguns receptores. É recomendada também a realização de fenotipagem dos antígenos eritrocitários dos sistemas Rh (antígenos D, C, c, E, e) e Kell (K1), dentre outros, para atender a demanda de pacientes politransfundidos. Todos os resultados destes exames são confrontados com resultados prévios (doações anteriores) registrados no sistema do

serviço e, se houverem discrepâncias, as mesmas devem ser solucionadas antes da liberação dos hemocomponentes (76).

1.2.2.1 Exames para triagem de agentes transmissíveis pelo sangue

Atualmente é obrigatória a realização de testes laboratoriais de alta sensibilidade a cada doação por métodos sorológicos e/ou moleculares, com a finalidade de detectar agentes infecciosos que possam ser transmitidos via transfusão visando à redução do risco de transmissão de doenças e, consequentemente, a proteção do receptor (76, 77).

Os testes sorológicos devem ser realizados individualmente para cada amostra, podem ser usados métodos diretos ou indiretos para detecção de antígenos do agente infeccioso ou anticorpos do indivíduo e, obrigatoriamente, devem apresentar uma alta sensibilidade (mínimo 99,8%) para reduzir o número de casos falso-negativos. Entretanto, estes métodos são incapazes de detectar a infecção em doadores em período de janela imunológica (76).

Os testes NAT (Nucleic Acid Tests - Testes de detecção de ácido nucleico) são testes moleculares altamente sensíveis e são utilizados para prevenção de casos de potencial transmissão transfusional provinda de doadores em fase de janela imunológica (55). No Brasil são realizados nos bancos de sangue brasileiros na rotina da triagem para os vírus da Hepatite B e C (HBV e HCV) e HIV (78). Os testes NAT podem ser realizados individualmente para cada amostra ou em pool (6 amostras) (76).

Tabela 4 - Teste para agentes infecciosos obrigatórios em todo território nacional

Agente infeccioso	Testes realizados	
	Sorológicos	Moleculares
Vírus da Hepatite B (HBV)	Detecção do antígeno de superfície do vírus HBV (HBsAg) Detecção de anticorpo contra o capsídeo do HBV (anti-HBc)	NAT para HBV
Vírus da Hepatite C (HCV)	Detecção de anticorpo anti-HCV ou detecção combinada de anti-HCV e antígeno HCV	NAT para HCV
Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	Detecção de anticorpo contra o HIV (incluindo subtipos 1, 2 e O) ou detecção combinada de anticorpo contra o HIV e detecção do antígeno p24 do HIV	NAT para HIV
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Detecção de anticorpo anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	
<i>Treponema pallidum</i>	Detecção de anticorpo anti-treponêmico ou não-treponêmico	
Vírus T-Linfotrófico Humano (HTLV 1/2)	Detecção de anticorpo contra o HTLV1/2	

Fonte: adaptado de Brasil. Ministério Da Saúde, 2013

Além dos testes citados no quadro acima, devem ser realizados testes para detecção do citomegalovírus (CMV) e malária (*Plasmodium sp.*) em casos ou locais específicos. O teste para CMV em hemocomponentes é recomendado em casos de receptores transplantados CMV negativos, recém-nascidos de mães CMV negativas ou com resultados sorológicos desconhecidos e transfusões intrauterinas. Porém, se forem utilizados hemocomponentes desleucocitados o teste não é necessário. Os testes para pesquisa do *Plasmodium sp.* e seus antígenos são realizados em áreas endêmicas para malária onde há transmissão ativa, independente da incidência parasitária da doença avaliado pelo IPA (Índice Parasitário Anual). O candidato que reside em área de alto risco (IPA alto) e que tenha tido febre ou suspeita de malária nos últimos 30 dias é considerado inapto para doação. Já candidatos que residem em áreas não endêmicas são considerados inaptos se tiverem viajado para áreas endêmicas há menos de 30 dias. E, em áreas endêmicas ou não, é considerado inapto definitivo o candidato que teve infecção por *Plasmodium malariae* (76).

Os hemocomponentes somente são liberados se todos esses testes descritos resultarem em negativos/não reagentes. As bolsas que apresentam resultados positivos/reagentes são descartadas e os doadores correspondentes convocados para comparecerem ao serviço a fim de receberem orientações, realizarem coleta de nova amostra para repetição do exame alterado e de outros exames e, se necessário, serem encaminhados para atendimento especializado. Esses doadores são excluídos do banco de doadores aptos, tornando-se bloqueados para doação no sistema do serviço (76).

1.2.3 Transfusão de hemocomponentes e hemovigilância

Apesar de serem consideradas muito seguras atualmente, as transfusões de hemocomponentes ainda possuem riscos a seus receptores e devem ser indicadas somente após uma avaliação criteriosa. Cada hemocomponente tem uma indicação específica e é prescrito de acordo com as condições e necessidades de cada paciente, tendo como funções principais suporte a tratamentos e a procedimentos cirúrgicos, como descrito na tabela abaixo (77).

Tabela 5 - Indicações clínicas para transfusões dos principais hemocomponentes

Hemocomponente	Principais indicações clínicas
Concentrado de hemácias (CH)	Pacientes com redução da massa de hemoglobina (ex: pacientes com anemia com repercussão hemodinâmica).
Concentrado de plaquetas (CP)	Controle de sangramentos em pacientes com plaquetopenia (por baixa produção pela medula óssea ou por plaquetopatias) ou na prevenção de sangramentos em pacientes com plaquetopenia que serão submetidos a procedimentos que oferecem risco de sangramentos.
Plasma fresco congelado (PFC)	Reposição de fatores de coagulação em pacientes com sangramentos ativos e para pacientes portadores de púrpura trombocitopênica trombótica (pode ser indicado também o PIC).
Crioprecipitado	Reposição de fibrinogênio e produção de cola de fibrina.
Concentrado de granulócitos (CG)	Pacientes com número de granulócitos menor que 500/ μ l com perspectiva de recuperação de granulócitos e com infecção documentada e tratada, mas sem resposta ao tratamento.

*O plasma comum (PC) não é usado clinicamente no Brasil, mas pode ser utilizado para fracionamento industrial.

Fonte: Adaptado de Brasil. Ministério Da Saúde, 2013

Para realização de uma transfusão é necessária coleta de amostras do receptor para testes pré-transfusionais. Estes testes são obrigatórios a cada transfusão solicitada para o paciente e consistem em: tipagem ABO e RhD, compatibilidade ABO e Rh com a bolsa selecionada, pesquisa de antígenos eritrocitários e anticorpos irregulares (pacientes politransfundidos) (76).

A terapia transfusional é um processo que envolve risco mesmo com indicação clínica precisa e administração correta, pois há chances de ocorrência de incidentes transfusionais imediatos ou tardios. Antes da instalação de uma transfusão deve-se aferir a temperatura, frequência cardíaca, pressão arterial e frequência respiratória do receptor. Em seguida, o profissional capacitado e treinado instala a bolsa com gotejamento inicial lento e de preferência utilizando-se filtros que impeçam a passagem de coágulos ou grumos de plaquetas e leucócitos. O mesmo profissional que instalou a transfusão deve permanecer junto ao paciente até o término da transfusão aferindo seus sinais vitais e averiguando se há qualquer intercorrência ou reação transfusional. Se o paciente apresentar qualquer sinal de reação adversa a transfusão deve ser interrompida e um médico deve avaliar a conduta a ser tomada. Ao término da transfusão o paciente deve ter os sinais vitais aferidos novamente e comparados com os parâmetros anteriores, caso ocorra alguma alteração deve-se comunicar ao médico responsável. Recomenda-se também que o paciente seja monitorado pelo menos em até 01 hora após o término da transfusão e que seja orientado a comunicar à equipe de saúde se apresentar sinais e sintomas sugestivos

de reações transfusionais: calafrios, febre, náuseas e/ou vômitos, cefaléia, urticária, dores, alteração na coloração da pele ou urina, ou qualquer outro evento que considere anormal (79).

1.3 DENGUE EM DOADORES DE SANGUE

Apesar da dengue ser transmitida principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*, casos de transmissão da doença por acidentes com perfuro cortantes contaminados (80), transfusões de hemocomponentes de doadores virêmicos (38, 81-86), transplantes de órgãos sólidos e medula (87) e por via vertical (88) já foram descritos na literatura.

O Comitê de Doenças Transmissíveis por Transfusão da *American Association for Blood Banks* (AABB), identificou o DENV como um dos três grandes agentes de risco potencial de transmissão através de transfusões nos Estados Unidos e no Canadá (89). A razão disto é que como a maioria dos indivíduos infectados pelos DENV são assintomáticos, seja por estar no início da infecção (período de incubação intrínseca) ou por ser simplesmente naquele indivíduo uma infecção absolutamente assintomática, há a possibilidade concreta da doação de sangue por estes indivíduos, fato este já comprovado por trabalhos que demonstram a presença de RNA do DENV em doadores de sangue de diferentes países (85, 86, 90-93).

A Tabela 6 sumariza os estudos revisados que investigaram as taxas de viremia em doadores de sangue em diferentes regiões e o número anual de casos reportados de dengue no período de realização dos estudos.

Tabela 6 – Resumo dos artigos revisados sobre viremia de DENV em doadores de sangue

Local/período	Taxa de viremia	Frequência de doações virêmicas	Número anual de casos reportados*	Referência
Porto Rico (set-out 2005)	0,07% (12 de 16.521)	1 a cada 1.376,7	5.701	Mohammed et al., 2008
Porto Rico (jul-dez 2007)	0,19% (29 de 15.350)	1 a cada 529,3	11.012	Stramer et al., 2012
Honduras (set 2004–jan 2005)	0,30% (9 de 2994)	1 a cada 332,6	18.843	Linnen et al., 2008
Austrália (mar-set 2003)	0% (0 de 5879)	0	449	
São Paulo/SP (fev-abr 2003)	0,04% (3 de 4858)	1 a cada 1.619,3	2.876	
Belém, Rio Branco, Tupã (jan-2006)	0% (0 de 205)	0	Rio Branco/AC: 180 Belém/PA: 1093 Tupã/SP: 272	Lavezzo et al., 2010
Ribeirão Preto/SP (fev-mai 2010)	0,40% (2 de 500)	1 a cada 250	26.625	Dias et al., 2012
Rio de Janeiro/RJ (fev-jun 2012)	0,51% (200 de 39.134)	1 a cada 195,7	137.783	Sabino et al., 2015
Recife/PE (fev-jun 2012)	0,80% (313 de 39.134)	1 a cada 125,0	31.799	

* Fonte: Ministério da Saúde/SVS- Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN

Fonte: autoria própria, 2019

Em estudos realizados em Porto Rico, a viremia encontrada em doadores de sangue assintomáticos fora do período de epidemia durante os meses de setembro a dezembro de 2005 foi de 0,07% (91) e de 0,19% durante a epidemia (junho a dezembro) no ano de 2007 (86).

Já Linnen e cols. (90) observaram taxas de viremia que variaram de 0,30% em Honduras (entre os anos de 2004 e 2005) e 0,04% no Brasil (São Paulo - 2003) e 0% na Austrália que não é um país endêmico para dengue. Em um estudo realizado por Lavezzo e cols. no ano de 2006 com amostras de Belém/PA (50 amostras) e Rio Branco/AC (50 amostras) fora do período de epidemia e em uma pequena cidade do interior de São Paulo (Tupã) (105 amostras) vivenciando uma epidemia, nenhuma amostra positiva foi detectada (94). Já no estudo realizado por Dias e cols. (92) foi encontrada uma positividade para DENV RNA de 0,4% em Ribeirão Preto no ano de 2010.

O maior estudo realizado sobre dengue transfusional até o momento foi conduzido por Sabino e cols. durante epidemias de dengue por DENV-4 em duas grandes cidades brasileiras, Recife/PE e Rio de Janeiro/RJ, no ano de 2012, no qual a viremia por DENV-4 encontrada foi de 0,51% nas amostras do Rio de Janeiro e 0,80% em Recife (podendo chegar a taxas de 1%-2% durante o período de pico da

epidemia), taxas que são superiores a outros estudos mencionados anteriormente (85).

1.3.1 Dengue transfusional

Até o momento, poucos casos de dengue transfusional foram reportados no mundo:

O primeiro caso documentado ocorreu em Hong Kong no ano de 2002. Um doador que tinha realizado uma doação (julho de 2002) e após sete dias desenvolveu erupção cutânea generalizada, foi selecionado em outubro de 2002 como um caso positivo por sorologia (IgM anti-DENV positivo) durante um estudo de revisão de casos da doença e, posteriormente, teve o material de sua doação analisado, no qual foi detectada a presença de DENV-1 pela técnica de RT-PCR. Analisando o prontuário da receptora desta doação virêmica (um concentrado de hemácias (CH) transfundido devido a um quadro de anemia e pancitopenia), foi observado que a mesma desenvolveu febre, cefaleia, mialgia, artralgia, dor retro orbital 2 dias após a transfusão e que a febre cessou 3 dias depois com plena recuperação da paciente. A mesma somente foi tratada com antibióticos pois foi constatada uma infecção urinária. Após aproximadamente 2 meses da doação (outubro de 2002), a receptora foi convocada para exames e apresentou IgM anti-DENV positivo e título de 1:2560 no teste de inibição de hemaglutinação, o que confirmou o caso de dengue transfusional (81);

Na cidade de Singapura, em julho de 2007, uma doadora de repetição informou ao banco de sangue que apresentou febre e mialgia um dia após a doação de sangue. Sua amostra de plasma do dia da doação foi analisada pela técnica de qPCR e o resultado foi positivo para DENV-2. Essa doação deu origem a três hemocomponentes (concentrado de hemácias (CH), plasma fresco congelado (PFC) e concentrado de plaquetas (CP)) que foram transfundidos em três receptores. O receptor 1 recebeu o CH e apresentou febre, mialgia e pequeno derrame pleural dois dias após a transfusão, com resultado positivo no qPCR para DENV-2 e soroconversão para IgM e IgG anti-DENV. O receptor 2 recebeu o PFC e apresentou febre, icterícia, mal-estar e agravamento da trombocitopenia e do derrame pleural dois dias após a transfusão, com resultado positivo no qPCR para DENV-2 e IgG anti-DENV positivo. O receptor 3 recebeu o CP e não apresentou nenhum sintoma da

doença após a transfusão, o qPCR para DENV não foi realizado, mas o paciente apresentou evidências de uma dengue recente no follow-up (IgM e IgG anti-DENV positivos). Os produtos de PCR foram clonados e sequenciados, confirmando a infecção pelo mesmo tipo viral e como as manifestações sintomáticas ocorreram logo após as transfusões e em um período de internação em um ambiente livre de mosquitos, os casos foram confirmados como dengue transfusional com recuperação total dos pacientes (83).

Em Porto Rico, um receptor recebeu 160mL de CH em setembro de 2007 e desenvolveu a FHD (agora classificada como dengue grave), com febre 3 dias após a transfusão (que durou por 5 dias), trombocitopenia, manifestações hemorrágicas e extravasamento plasmático (evidenciado pelo desenvolvimento de hipotensão e hipoalbuminemia no período de convalescença). O diagnóstico de dengue foi determinado após o resultado positivo por qPCR para DENV-2 de uma amostra do receptor testada 5 dias após o aparecimento dos sintomas. A análise da amostra da doação apresentou resultado negativo para IgM anti-DENV, isolamento viral em células C6/36 positivo, TMA positivo para DENV e qPCR positivo para DENV-2 com carga viral de $1,35 \times 10^8$ cópias/mL, sendo que a doadora não apresentou nenhum sintoma antes ou após a doação. Foi realizado também o sequenciamento dos vírus presentes nas amostras e os mesmos apresentaram 100% de identidade, mostrando que os vírus eram idênticos e confirmando a transmissão por transfusão (86).

Também em Porto Rico foi realizado um estudo retrospectivo com o principal objetivo de avaliar a sensibilidade da detecção do antígeno NS1 de DENV por sorologia em comparação com a técnica de TMA para detecção de DENV RNA em doadores assintomáticos. O teste de NS1 detectou somente 20% das doações DENV RNA positivas foram detectadas no período do estudo. Em agosto de 2012 o teste de TMA substituiu a triagem por sorologia de NS1 nos doadores de sangue em Porto Rico mas, mesmo assim os doadores continuaram a ser testados para NS1 por sorologia para avaliar novamente a sensibilidade do teste que mostrou uma sensibilidade ainda menor neste período, onde somente 13% das doações DENV RNA positivas foram detectadas. Consequentemente, neste estudo foi identificado que três receptores receberam CH de quatro doadores DENV RNA positivos detectados por TMA (negativos na sorologia para NS1). O receptor 1 foi admitido devido a sintomas de anemia e transfundido com 3 unidades de CH (uma continha 7×10^7 cópias / mL de DENV-4 RNA) e, após três dias da transfusão, desenvolveu febre.

As culturas de sangue e urina foram negativas e ele continuou febril por 3 dias, apesar de antibióticos de amplo espectro terem sido administrados. Na defervescência ele desenvolveu leucopenia, trombocitopenia, melena e extravasamento de plasma grave, resultando em derrames pleurais e pericárdicos bilaterais, hipoalbuminemia e choque, sintomas compatíveis com febre hemorrágica da dengue ou dengue grave. O paciente foi tratado e teve alta 15 dias depois. O receptor 2 foi admitido com sintomas de icterícia e recebeu uma unidade de CH DENV RNA positiva. Desenvolveu febre 2 dias após a transfusão e hipotermia 2 dias mais tarde e nenhum outro sinal ou sintoma de dengue foi relatado. As culturas de sangue foram negativas e recebeu alta 4 dias após a transfusão. O receptor 3 foi admitido para tratar melena e anemia sintomática. Desenvolveu febre 1 dia após receber um CH DENV RNA positivo. A febre provavelmente foi devido a sepse diagnosticada por culturas de sangue e urina positivas. Nenhum outro sinal ou sintomas da dengue foram relatados. Ele recebeu alta 12 dias após a transfusão. Todos os receptores foram testados para detecção de RNA de DENV e nenhum foi positivo. Somente o receptor 3 possuía IgM anti-DENV em uma amostra colhida mais de 6 meses após a transfusão, o que não comprova a infecção por meio da transfusão. O caso do receptor 1 foi considerado uma dengue por transfusão já que o paciente apresentou sintomas de dengue grave, o caso do receptor 2 foi considerado um possível caso de dengue sem sintomas de alerta ou grave, enquanto que o caso do receptor 3 a dengue por transfusão pode ter ocorrido mas a explicação mais plausível para o sintomas é devido a sepse (38).

No Brasil, em abril de 2014, uma doadora regular de plaquetas afirmou ter desenvolvido a doença dias após a doação. Dois receptores foram transfundidos com CP provenientes desta doação. A amostra da doação foi analisada e teve resultados para IgM e IgG anti-DENV negativos, assim como qPCR para DENV negativo. Após 21 dias da doação a doadora foi convocada para novos exames, onde apresentou soroconversão para IgG e IgM anti-DENV, confirmando a doença. O receptor 1 desenvolveu febre e hipotensão após 5 dias da transfusão. Após o comunicado da doadora, uma amostra pré-transfusional deste receptor foi analisada e os resultados para IgM e IgG anti-DENV e DENV RNA foram negativos. Outras duas amostras foram coletadas deste mesmo receptor, uma durante a fase febril que foi positiva para DENV-1 com carga viral de 872.100 cópias/mL e outra após 7 dias, que foi positiva para DENV-1 com carga viral de 6.192 cópias/mL e para IgM anti-DENV. Este paciente

foi tratado e recebeu alta dias depois. Já o receptor 2 não desenvolveu nenhum sintoma e todos os exames foram negativos (82).

Novamente em Singapura, em 2015, uma receptora recebeu um CH e desenvolveu febre após quatro dias da transfusão e dois dias depois trombocitopenia. Foi realizada sorologia para dengue, onde o resultado de IgM anti-DENV foi positivo e de IgG anti-DENV negativo, indicando uma infecção primária recente. Houve suspeita da transmissão da dengue por transfusão, pois a paciente encontrava-se hospitalizada desde 10 dias antes do início dos sintomas. O doador desta unidade de CH teve dengue dois dias após a doação e não comunicou ao banco de sangue. Para confirmar a transmissão, as amostras do receptor e do PFC do doador (que não foi transfundido) foram analisadas por RT-PCR para DENV, com resultado positivo e sequenciadas por Sanger confirmando DENV-2 com 100% de identidade, confirmando assim a transmissão transfusional. A paciente foi tratada e recebeu alta dias depois (84).

No estudo de Sabino e cols. (85) realizado em Recife e Rio de Janeiro, no ano de 2012 foi observado que 42 unidades de hemocomponentes positivas para DENV RNA foram transfundidas em 35 receptores. Analisando-se detalhadamente todos os casos, foram confirmados 6 casos de dengue transfusional. Estes 6 casos, analisados no contexto de outros 10 receptores suscetíveis expostos aos hemocomponentes virêmicos, que se mantiveram negativos para DENV RNA e IgM anti-DENV no período de acompanhamento, permitiu aos autores estimarem uma taxa de transmissibilidade de 37,5%. Foi concluído que aproximadamente 1/3 dos hemocomponentes provenientes de doações virêmicas podem transmitir o DENV e que durante o período de pico de epidemia 1%->2% das doações podem ser DENV RNA positivas e, portanto, 0,3% a 0,6% de todas as transfusões podem transmitir DENV. Foi observado também que a transmissão era independente da carga viral e que todos os 3 componentes geralmente obtidos a partir de doações de sangue (CH, PFC, CP), independentemente de seu tempo de armazenamento foram capazes de transmitir o DENV-4, dados estes também observados em outro estudo prévio em Singapura no ano de 2007 (83). Os sintomas e o tempo de aparecimento dos sintomas não possuíam diferença estatística significativa entre os casos comprovados de dengue transfusional e os casos de receptores não expostos usados como controles.

Ao analisar estes trabalhos podemos concluir que todos estes casos de dengue transfusional só foram descobertos e investigados após doadores revelarem

que desenvolveram sintomas da doença dias após as doações; por terem os produtos de suas doações analisados a procura do RNA de DENV após os receptores desenvolverem sintomas relacionados à doença ou ter sido detectada viremia ou anticorpos IgM anti-DENV em suas amostras por estudos retrospectivos e estes dados terem sido cruzados com os dos receptores, já que não havia um sistema de screening ou vigilância implementados nestes locais.

2 JUSTIFICATIVA

Fazem-se necessários estudos aprofundados com grande número de amostras sobre a dengue transmitida por transfusão, especialmente em regiões vivendo epidemias para poder melhor avaliar e quantificar o risco transfusional, além de sugerir quais métodos seriam mais adequados para uma eventual triagem laboratorial e uma futura conduta de prevenção.

Em Barretos localiza-se o Hospital de Câncer de Barretos (HCB), onde funciona o Hemonúcleo responsável pela medicina transfusional da Fundação Pio XII e de outros serviços de saúde da cidade e região. Mensalmente, o Hemonúcleo atende em torno de 1000 doadores de sangue e realiza, em média, 1090 transfusões de hemocomponentes em 300 pacientes.

O ano de 2013 foi uma das primeiras grandes epidemias registradas na cidade de Barretos/SP quando comparada a anos anteriores segundo dados do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação). Nos anos anteriores foram registrados: 81 casos em 2009, 1.128 casos em 2010, 1.116 casos em 2011 e 225 casos em 2012. Apesar de ser uma cidade pequena, com aproximadamente 112 mil habitantes, foram contabilizados 4.297 casos confirmados até o final 2013, perfazendo uma incidência de 3.836 casos/100.000 habitantes, como ilustrado no Gráfico 1. A epidemia de 2013 só foi superada pela epidemia que ocorreu no ano de 2016. Após dois anos de poucos casos da doença em 2014 com 48 casos notificados, e em 2015 com 2.619 casos, em 2016 foram notificados 5.308 casos. Já em 2017 houve novamente uma diminuição no número de casos reportados com somente 110 casos.

Portanto, somando-se a grande incidência da dengue ao movimento transfusional demandado pelos pacientes oncológicos e a existência de uma excelente infraestrutura de pesquisa do HCB, temos uma oportunidade ideal de fazer uma contribuição à hemoterapia, procurando responder esta eloquente questão do risco transfusional da dengue por doadores virêmicos em períodos de epidemia da doença.

Gráfico 1 – Casos de notificados de dengue por mês nos anos de 2009 a 2013 na cidade de Barretos/SP, segundo dados do SINAN.

Fonte: autoria própria, 2019

3 OBJETIVO

Estimar o risco de transmissão transfusional da dengue em doadores de sangue do Hemonúcleo do Hospital de Câncer de Barretos (HCB) durante uma epidemia da doença na cidade de Barretos-SP em 2013.

3.1 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

1. Estimar a incidência da dengue na população de doadores de sangue do HCB.
2. Estimar a prevalência de marcadores de exposição à dengue na população de doadores de sangue do HCB.
3. Determinar a prevalência dos sorotipos da dengue nos casos de doadores virêmicos.
4. Comparação de resultados sorológicos e de RT-qPCR dos doadores com casos sintomáticos notificados de dengue no período do estudo.

4 CASUÍSTICA

Foram disponibilizadas para este estudo 1.822 amostras de plasma (n=1.353) e soro (n=469) criopreservadas de doadores de sangue coletadas no Hemonúcleo do HCB entre fevereiro e maio de 2013.

De acordo com a RDC 57 de 2010 (95) e Portaria 158 de 2016 (76) , o soro ou plasmateca de doadores de sangue devem ser armazenados por no mínimo 6 meses para eventuais reanálises. Após o tempo exigido legalmente para retenção destas amostras, ao invés de serem descartadas, como se faz na rotina, as mesmas foram utilizadas no presente trabalho.

4.1 CRITÉRIO DE INCLUSÃO

Todos os indivíduos elegíveis à doação de sangue no período de 28 de fevereiro a 02 de maio de 2013, que possuíam alíquotas de soro ou plasmateca criopreservadas.

4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Baseado em normas da Resolução 466/12, estará estabelecido o direito de confidencialidade dos doadores de sangue, sendo os mesmos identificados através do número de doação e registro hospitalar assegurando-lhes o anonimato.

Por se tratar de um estudo retrospectivo e pelo fato da dengue ser uma doença aguda e geralmente autolimitada, mesmo após a identificação de um caso não foi realizada qualquer intervenção clínica relacionada aos doadores de sangue. Portanto, o estudo não resultará em benefícios diretos, porém, após conclusões poderá ser levantada a necessidade de instituir barreiras na dengue transfusional, ocasionando benefícios indiretos aos receptores de transfusão sanguínea.

Como não é viável solicitar termo de consentimento de forma retrospectiva a estes doadores, foi obtida a autorização para o uso destas 1.822 amostras pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos (CEP-HCB) cadastrado sob o número 738/2013 e aprovado na Plataforma Brasil sob o número de parecer 1008888 (CAAE: 21135513.4.0000.5437), uma vez que foi

mantido o anonimato dos doadores, trabalhando-se apenas com o número de identificação das amostras vinculadas ao número de doação (Anexo A).

Este projeto também foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq: 15654) (Anexo A).

O projeto foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) sob o número 444961/2014-3 (Anexo B)*.

* O Anexo C contém os artigos publicados ou no prelo produzidos durante o período do mestrado.

5 MATERIAS E MÉTODOS

5.1 TESTES LABORATORIAIS

5.1.1 Pesquisa de anticorpos anti-DENV do tipo IgM

Para a pesquisa de anticorpos anti-DENV do tipo IgM foi utilizado o teste qualitativo de ELISA Dengue Virus IgM CaptureDxSelect™ (Focus Diagnostics) para detecção de anticorpos IgM anti-vírus da dengue dos tipos 1 a 4 nas amostras de soro/plasma criopreservadas.

Este ensaio é um ELISA de captura onde as cavidades da microplaca são revestidas com anticorpos específicos anti-IgM humana. Assim, quando as amostras, calibradores e controles positivos e negativos diluídos (solução de PBS com proteína, surfactante e preservativo) são incubados nas cavidades, o IgM presente nas amostras liga-se ao anti-IgM humano. Após esta etapa são realizadas lavagens com solução tampão salina com surfactante, onde os reagentes inespecíficos são removidos e adiciona-se o antígeno do vírus da dengue nas cavidades, que são incubadas, e se o IgM anti-DENV estiver presente na amostra, ocorre a ligação do antígeno da dengue. O antígeno não ligado é removido por lavagem e adiciona-se o conjugado/peroxidase (HRP) anti-DENV e incuba-se. Se o antígeno de dengue for retido pelo IgM anti-DENV da amostra, o conjugado se liga ao antígeno nas cavidades. O excesso de conjugado é removido por lavagem. O substrato cromógeno (TMB - tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio em tampão salina fosfato) é adicionado e a cor se desenvolve. Depois de adicionar o reagente de bloqueio (ácido sulfúrico 1M), a mudança de cor é quantificada pela leitura espectrofotométrica das densidades ópticas (DO) das amostras, que é diretamente proporcional à quantidade de IgM específica presente na amostra. As DOs são comparadas com as leituras do calibrador que determinam o cut-off que para determinar os resultados dos controles positivos e negativos e das amostras. O resultado do teste só é validado se todos os valores de Cut-off e controles forem compatíveis com os parâmetros especificados pelo fabricante. A especificidade deste teste segundo o fabricante é de 97% e a sensibilidade de 96%.

Figura 6 - Esquema representativo do ELISA de captura para IgM anti-DENV
 Fonte: autoria própria, 2019

5.1.2 Pesquisa de anticorpos anti-DENV do tipo IgG

Para a pesquisa de anticorpos anti-DENV do tipo IgG foi realizado o teste qualitativo de ELISA Dengue Virus IgG CaptureDxSelect™ (Focus Diagnostics) para detecção de anticorpos IgG anti-vírus da dengue dos tipos 1 a 4 nas amostras de soro/plasma criopreservadas.

Este ensaio é um ELISA indireto onde as cavidades da microplaca são revestidas com proporções iguais de vírus inativados e purificados da dengue dos tipos 1 a 4. As amostras, calibradores e controles positivos e negativos diluídos (solução de PBS com proteína, surfactante e preservativo) são incubados nas cavidades para que os anticorpos específicos anti-DENV das amostras reajam com o antígeno. Reagentes inespecíficos são removidos por lavagens com solução tampão salina com surfactante, adiciona-se o conjugado/peroxidase (HRP) anti-IgG humana que reage com IgG específica. O excesso do conjugado é removido por lavagem. O substrato cromógeno (TMB - tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio em tampão salina fosfato) é adicionado e a cor se desenvolve. Depois de adicionar o reagente de bloqueio (ácido sulfúrico 1M), a mudança de cor resultante é quantificada pela leitura espectrofotométrica das densidades ópticas (DO) das amostras. As DOs são comparadas com as leituras do calibrador, que determinam o cut-off, que para determinar os resultados dos controles positivos e negativos e das amostras. O

resultado do teste só é validado se todos os valores de Cut-off e controles forem compatíveis com os parâmetros especificados pelo fabricante. A especificidade deste teste segundo o fabricante é de 93% e a sensibilidade de 96%.

Figura 7 - Esquema representativo do ELISA indireto para IgG anti-DENV
 Fonte: autoria própria.

5.1.3 Extração dos ácidos nucleicos

A extração dos ácidos nucleicos foi realizada por automação utilizando-se o aparelho e reagentes NucliSENS easyMag® (Biomérieux™) de acordo com as instruções do fabricante, sempre com um volume inicial de 500µL de plasma/soro e eluição em 50µL.

O princípio de extração de ácidos nucleicos totais utilizado nesta plataforma automatizada é a extração por sílica magnética (Figura 8). Durante a incubação das amostras previamente lisadas com a sílica magnética, todo ácido nucleico presente na amostra será capturado pelas partículas de sílica. O aparelho possui um ímã que atrai toda a sílica magnética ligada ao ácido nucleico e permite que o mesmo seja purificado por meio de lavagens com diferentes tampões. Após as etapas de lavagens, é realizada uma etapa de aquecimento, onde a sílica é desligada do ácido nucleico por meio do calor e o material genético é eluído em tampão. Na etapa final a sílica magnética é separada do material eluído por meio do ímã presente no aparelho.

Figura 8 - Esquema do princípio de extração da plataforma NucliSENS easyMag® (Biomérieux™)

Fonte: Adaptado de Biomérieux™ website (disponível em: <https://www.biomerieux.com.br/produto/nuclisensr-easymagr>)

O aparelho NucliSENS easyMag® (Biomérieux™) faz a extração simultânea de até 24 amostras por rodada. A cada rodada onde foram extraídas as amostras, foram extraídos também um controle negativo (plasma negativo (cedido pela Fundação Pró-Sangue e previamente testado para presença de DENV) ou H₂O DEPC) e um controle positivo (plasma negativo batizado com 30µL de sobrenadante de cultura de DENV-1) para serem nossos controles de validação de rodada de extração.

Os controles utilizados como controles de reação do qPCR foram extraídos em uma única rodada utilizando-se plasma negativo batizado com 30µL de sobrenadante de cultura de DENV-4.

Após a extração, o material eluído foi armazenado em freezer -80°C até sua utilização.

5.1.4 Síntese do cDNA

Para a realização da técnica de qPCR *Two-Steps* foi necessária a síntese do cDNA (DNA complementar) a partir do DENV RNA utilizando-se o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™) de acordo com as instruções do fabricante e armazenado em freezer -20°C até sua utilização.

5.1.5 PCRs em tempo real para detecção do RNA viral

Foram realizadas duas técnicas de PCR em tempo real (qPCR), *One-Step* e *Two-Steps*, utilizando-se o aparelho QuantStudio5 PCR System (ThermoFischer™) e um conjunto de *primers* e sonda que detectam igualmente os 4 sorotipos virais (Tabela 7) (52)

A técnica *Two-Steps* foi realizada, segundo o seguinte protocolo: 1x Taqman Master Mix (Applied Biosystems™), 0,9 µM do *primer* HU *forward*, 0,9 µM do *primer* HU *reverse*, 0,25 µM da sonda HU, 5 µL de cDNA e H2O para um volume final de 25 µL. A ciclagem utilizada foi de 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguida de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Este protocolo tem sensibilidade de detecção de 100 cópias/mL conforme determinação prévia em nosso laboratório por análise de Probit (dados não publicados), utilizando padrões de DENV RNA quantificados que consistem em preparações inativadas por calor e liofilizadas de linhagens derivadas de cultura celular com concentrações de 13.500 unidades/mL, 69.200 unidades/mL, 23.400 unidades/mL e 33.900 unidades/mL para DENV-1 a -4, respectivamente. Estes padrões foram fornecidos pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos EUA (Estados Unidos da América) (96).

Já a técnica *One-Step* foi realizada utilizando-se o PrimeTime® Std qPCR Assay (Integrated DNA Technologies (IDT)), que é um mix que contém os *primers forward* e *reverse* e sonda genéricos, seguindo o seguinte protocolo: 1x Taqman Fast Virus 1-Step Master Mix (Life Technologies™), 500nM de primers forward e reverse e 250nM de sonda (PrimeTime® Std qPCR Assay – IDT® (Integrated DNA Technologies) e 10,3 µL de RNA para um volume final de 14 µL. A ciclagem utilizada foi de 50°C por 10 minutos, 95°C por 20 segundos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 10 segundos e 60°C por 40 segundos. Este protocolo tem sensibilidade de detecção de 100 cópias/mL, conforme determinação prévia em nosso laboratório por análise de Probit (dados não publicados) utilizando os mesmos padrões de DENV RNA descritos acima.

Tabela 7 - Sequência de primers e sonda genéricos

Primers	Sequência 5'-3'
HU FORWARD	GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCC
HU REVERSE	GAGACAGCAGGATCTCTGGTC
Sonda	
HU	FAM – AGCATATTGACGCTGGGA – MGB

Fonte: autoria própria, 2019

5.1.6 Sorotipagem das amostras DENV RNA positivo

As amostras positivas para o RNA viral foram submetidas à sorotipagem através do método de qPCR *One-Step* utilizando-se um PrimeTime® Std qPCR Assay (Integrated DNA Technologies (IDT)) para cada um dos quatro tipos virais (Tabela 8), onde cada um contém um mix de *primers* e sondas tipos-específicos (53, 97) no aparelho QuantStudio5 PCR System (ThermoFischer™), de acordo com o seguinte protocolo: 1x Taqman Fast Virus 1-Step Master Mix (Life Technologies™), 500nM de *primers forward* e *reverse* e 250nM de sonda (PrimeTime® Std qPCR Assay – IDT® (Integrated DNA Technologies) e 10,3 µL de RNA para um volume final de 14 µL. A ciclagem utilizada foi de 50°C por 10 minutos, 95°C por 20 segundos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 10 segundos e 60°C por 40 segundos. Este protocolo tem sensibilidade de detecção de 100 cópias/mL, conforme determinação prévia em nosso laboratório por análise de Probit (dados não publicados) utilizando os mesmos padrões de DENV RNA descritos acima.

Tabela 8 - Sequências de primers e sondas para sorotipagem do DENV

Primers e sondas	Sequência 5'-3'
Dengue_1F	GACACCACACCCTTTGGACAA
Dengue_1R	CACYTGGCTGTCACCTCCAT
Dengue_Probe1	FAM-AGAGGGTGTTTAAAGAGAAAGTTGACACGCG-NFQ
Dengue_2F	CAGGTTATGGCACTGTCACGAT
Dengue_2R	CCATCTGCAGCAACACCATCTC
Dengue_Probe2	FAM- CTCTCCGAGAACAGGCCTCGACTTCAA-NFQ
Dengue_3F	GGGAAAACCGTCTATCAATA
Dengue_3R	CGCCATAACCAATTTTCATTGG
Dengue_Probe3	FAM-CACAGTTGGCGAAGAGATTCTCAAGAGGA-NFQ
Dengue_4R	AATCCCTGCTGTTGGTGGG
Dengue_4F	TGAAGAGATTCTCAACCGGAC
Dengue_Probe4	FAM-TCATCACGTTTTTGCGAGTCCTTTCCA-NFQ

Fonte: autoria própria, 2019

6 RESULTADOS

Dez amostras não possuíam volume suficiente para a realização dos testes sorológicos e/ou moleculares e por este motivo foram excluídas das análises, resultando em 1.812 amostras.

A distribuição do número de doadores que participaram do estudo por mês de coleta estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9 – Distribuição dos doadores por mês de coleta

Mês / 2013	Doações coletadas
Fevereiro	7
Março	909
Abril	895
Maio	1
Total	1.812

Fonte: autoria própria, 2019.

6.1 PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-DENV DO TIPO IGM E IGG

A tabela abaixo descreve os resultados das pesquisas de anticorpos anti-DENV do tipo IgM e IgG anti-DENV das 1.812 amostras testadas de acordo com os protocolos especificados pelo fabricante dos testes ELISA Dengue Virus IgG CaptureDxSelect™ (Focus Diagnostics) e ELISA Dengue Virus IgM CaptureDxSelect™ (Focus Diagnostics):

Tabela 10 - Resultados sorologias IgM e IgG anti-DENV

IgM	IgG		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	277 (90,2%)	30 (9,8%)	307 (16,9%)
Negativo	656 (43,6%)	849 (56,4%)	1505 (83,1%)
Total	933 (51,5%)	879 (48,5%)	1812 (100%)

Fonte: autoria própria, 2019.

O Gráfico 2 mostra a positividade de IgM e IgG anti-DENV nos doadores separados por semana de coleta excluindo-se as doações realizadas em fevereiro e

maio pois não representam uma casuística representativa (n=8), sendo: semana 9 (01/03/2013 a 02/03/2013), semana 10 (03/03/2013 a 09/03/2013), semana 11 (10/03/2013 a 16/03/2013), semana 12 (17/03/2013 a 23/03/2013), semana 13 (24/03/2013 a 30/03/2013), semana 14 (01/04/2013 a 06/04/2013), semana 15 (07/04/2013 a 13/04/2013), semana 16 (14/04/2013 a 20/04/2013), semana 17 (22/04/2013 a 27/04/2013), semana 18 (28/04/2013 a 30/04/2013).

Gráfico 2 – Número de doadores coletados e positividade de IgM e IgG anti-DENV por semana

Fonte: autoria própria, 2019

No Gráfico 2 podemos observar que a porcentagem de doadores IgM anti-DENV positivos foi de 14,1% na primeira semana (semana 9) para 17,3% na última semana (semana 18) do estudo, o que representa um aumento na positividade deste marcador. A análise da positividade de IgM anti-DENV foi realizada pelo seguinte

cálculo baseado no trabalho de Busch e cols. (93): $100 \times (17,3 - 14,1) / (100 - 14,1)$, resultando numa taxa de incidência de DENV de 3,7%. A positividade de IgG anti-DENV, taxa de prevalência, também aumentou de 44,9% para 46,4%.

6.2 PCRS EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DO RNA VIRAL

Foram testadas 1.812 amostras pelas técnicas de qPCR *Two-Steps* e *One-Step* para detecção do RNA viral. Detectamos DENV RNA em 7 amostras, como demonstrado na tabela a seguir, representando uma positividade de 0,38%.

Tabela 11 - Resultado das amostras positivas nos qPCRs genéricos

ID	Tipo de amostra	Ct <i>Two-Steps</i>	Ct <i>One-Step</i>
214901	Soro	40	34
215186	Plasma	36	30
216170	Plasma	40	35
216291	Plasma	41	36
216299	Plasma	30	24
216315	Soro	33	28
216641	Plasma	36	29

*Ct: Cycle Thershold no qual foi detectado a amplificação de cada amostra

Fonte: autoria própria, 2019

6.3 SOROTIPAGEM DAS AMOSTRAS DENGUE RNA POSITIVO

As 7 amostras positivas para DENV RNA foram testadas com *primers* e sondas específicos para cada sorotipo viral e todas foram positivas para DENV-4, exemplificado na tabela abaixo.

Tabela 12 – Resultado da sorotipagem das amostras DENV RNA positivas

ID	Tipo de amostra	Ct	Sorotipo
214901	Soro	30	DENV-4
215186	Plasma	25	DENV-4
216170	Plasma	30	DENV-4
216291	Plasma	32	DENV-4
216299	Plasma	20	DENV-4
216315	Soro	21	DENV-4
216641	Plasma	25	DENV-4

Fonte: autoria própria, 2019

6.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS DE SOROLOGIA DAS AMOSTRAS DENV-RNA POSITIVAS

Das amostras qPCR positivas para DENV (n=7) (Tabela 13), nenhuma foi positiva para IgM anti-DENV. Três amostras apresentaram resultado negativo e quatro foram positivas para IgG anti-DENV.

Tabela 13 - Resultados das sorologias das amostras qPCR positivas

IgM	IgG	
	Positivo	Negativo
Positivo	0	0
Negativo	4 (57%)	3 (43%)

Fonte: autoria própria, 2019

6.5 COMPARAÇÃO DE RESULTADOS SOROLÓGICOS E DE QPCR DOS DOADORES COM CASOS SINTOMÁTICOS NOTIFICADOS DE DENGUE

O Gráfico 3 mostra os resultados sorológicos e de qPCR dos doadores de sangue e o número de casos sintomáticos reportados ao SINAN no período de março e abril de 2013.

A análise foi realizada somente nas amostras de doadores dos meses de março (n=909) e abril (n=895) porque as amostras coletadas em fevereiro (n=7) e maio (n=1) não representam uma casuística relevante e não poderiam ser comparadas com casos reportados durante todos os dias dos respectivos meses.

No Gráfico 3 podemos observar que identificamos 2 (0,22%) doações DENV RNA positivas no mês de março e 5 (0,55%) no mês de abril, totalizando 7 doações virêmicas (casos assintomáticos) neste período. Durante os meses de março e abril foram notificados 601 casos sintomáticos de dengue (dados SINAN), portanto, podemos inferir que para cada 85,8 casos sintomáticos notificados havia uma doação DENV RNA positiva.

Para o marcador IgM anti-DENV a positividade foi de 15,95% (n=145) nos doadores coletados durante o mês de março e 17,98% (n=161) no mês de abril. E para IgG anti-DENV a positividade foi de 52,47% (n=447) no mês de março e 53,96% (n=483) no mês de abril.

Gráfico 3 – Número de casos sintomáticos notificados, doadores testados e resultados de qPCR, IgM e IgG anti-DENV no período de março a abril de 2013.

Fonte: autoria própria, 2019

7 DISCUSSÃO

A dengue é um problema de saúde pública mundial, sendo a arbovirose que se espalha mais rapidamente no mundo (14). Os surtos e epidemias da doença impactam os serviços de hemoterapia por vários fatores. Durante estes períodos há uma diminuição do número de candidatos à doação (somente 1,8% da população brasileira doa sangue) (98) e, conseqüentemente, diminuição dos estoques de hemocomponentes estocados disponíveis. Um dos estoques de hemocomponentes mais afetados é o de plaquetas, pois uma prática geralmente recomendada para pacientes com dengue e com baixa contagem de plaquetas é a transfusão deste hemocomponente, levando a sua alta demanda (99). Um grande fator de risco, ainda não totalmente estabelecido, relacionado à doença e aos serviços de hemoterapia é o grande número de indivíduos assintomáticos durante o período de viremia (em média 75% dos indivíduos) (14) que podem apresentar-se para a doação de sangue e transmitir este agente via transfusão de hemocomponentes virêmicos a receptores de sangue (38, 81, 82, 84-86, 100).

Neste estudo avaliamos amostras de doadores de sangue do Hemonúcleo do Hospital de Câncer de Barretos (HCB), localizado na cidade de Barretos no interior de São Paulo, obtidas no período de 28 de fevereiro a 02 de maio durante a epidemia ocorrida no ano de 2013. O objetivo foi estimar o risco de transmissão transfusional, a incidência e a prevalência de marcadores de exposição à dengue, determinar a prevalência dos sorotipos da dengue nos casos de doadores virêmicos e comparar o número de casos assintomáticos nesta população de doadores de sangue do HCB com o número de casos sintomáticos de dengue reportados no mesmo período.

Barretos é uma cidade pequena do interior de São Paulo que possuía aproximadamente 112 mil habitantes no ano de 2013. Neste ano ocorreu uma das maiores epidemias de dengue na cidade, com um total de 4.297 casos reportados, perfazendo uma incidência de 3.836 casos/100.000 habitantes. Como podemos observar no Gráfico 1, o período de pico da epidemia no ano de 2013 na cidade Barretos ocorreu nos meses de janeiro e fevereiro, diferentemente de anos anteriores onde o pico foi nos meses de março e abril. Nossa casuística teve início no dia 28 de fevereiro até 02 de maio, final do período de pico da epidemia, sendo que a grande maioria das amostras dos doadores de nossa casuística foram obtidas durante os meses de março e abril, como está exemplificado na Tabela 9.

Para avaliar a presença e eventual sorotipo do DENV utilizamos duas técnicas de PCR em tempo real, a *Two-Steps* e a *One-Step* (Tabela 11). O motivo desta escolha foi porque em testes realizados em nosso laboratório a técnica *One-step* mostrou-se mais sensível para detecção de DENV em amostras clínicas. Em nosso estudo essas técnicas apresentaram a mesma positividade nas amostras e somente diferiram nos resultados de Ct, concluindo-se que mesmo a técnica *One-Step* sendo mais sensível que a *Two-Steps* (média da diferença = 5,7 CTs), elas obtiveram o mesmo desempenho na detecção viral destas amostras. As principais limitações relativas aos testes moleculares utilizados foram:

- A ausência de um controle interno (Ex.: Vacina contra a poliomielite, RNAs sintéticos, etc.). Normalmente tais controles são utilizados para evitar resultados falso-negativos atestando que a extração de ácidos nucleicos foi realmente realizada em todas as amostras;
- A sensibilidade de 100 cópias/mL dos testes, principalmente por já ter sido descrito na literatura viremia de hemocomponentes de doadores de 36 cópias/mL, o qual foi transfundido em um receptor e ocasionou um caso de dengue transfusional (85).

Obtivemos 7 amostras positivas para DENV RNA em nossa casuística (n=1.812), representando um risco transfusional máximo de 0,38% o qual significa que a cada 258,9 doações uma era DENV RNA positiva.

O possível potencial de transmissão deste agente foi mostrado no estudo de Añez e cols. (101) o qual avaliou a distribuição do DENV-1 e 4 em hemocomponentes de doadores virêmicos em Porto Rico. Os DENVs foram detectados em todos os hemocomponentes testados: soro, coágulos, plasma e hemácias com títulos comparáveis entre diferentes componentes da mesma doação de doadores infectados por DENV-1 e DENV-4 e com a mesma sensibilidade no NAT. A detecção dos DENVs e vírions infecciosos até mesmo em coágulos após armazenamento refrigerado prolongado descrito neste estudo mostra o grande potencial de risco transfusional deste agente.

O único trabalho publicado até o momento na literatura que mostrou a possível taxa de transmissibilidade do DENV via transfusão foi o de Sabino e cols.

(85), no qual a taxa encontrada foi de 37,5%, mas não foi possível diferir os sintomas entre os casos comprovados de dengue transfusional e os casos de receptores não expostos usados como controles, sendo difícil analisar as características dos pacientes mais suscetíveis e identificar sintomas da dengue que seriam específicos aos indivíduos infectados. Portanto, se aplicarmos a taxa de transmissibilidade observada neste trabalho em nossa casuística o risco de transmissão transfusional seria de 0,14% (37,5% de 0,38%).

Os trabalhos que revisamos sobre viremia de DENV em doadores de sangue mostram taxas que variam de 0% a 0,80% (podendo chegar a 1-2% durante os períodos de pico da epidemia) dependendo do ano e local das casuísticas e principalmente em decorrência do tamanho das epidemias e incidência de casos de DENV que ocorreram nos anos dos estudos (85, 86, 90-92, 94). Logo o resultado que obtivemos era esperado devido a nossa casuística. O sorotipo encontrado em todas as amostras positivas para DENV RNA foi o DENV-4, que foi o sorotipo predominante e responsável pela epidemia do ano de 2013 segundo dados do Ministério da Saúde brasileiro (70).

Analisando os resultados dos testes sorológicos da Tabela 10, podemos observar uma positividade de 16,9% para IgM anti-DENV e 51,5% para IgG anti-DENV. A positividade de IgM anti-DENV indica uma infecção recente por DENV, podendo ser detectado a partir do quinto a até mais de noventa dias após doença aguda sintomática ou assintomática. Cerca de 90,2% dos doadores IgM anti-DENV positivos também eram IgG anti-DENV positivos, sendo assim não podemos afirmar se a infecção era primária ou não-primária, já que a presença conjunta de IgG e IgM anti-DENV pode ocorrer desde dez dias após a doença primária ou desde o primeiro dia em infecções não-primárias. No caso dos doadores IgM anti-DENV positivos e IgG anti-DENV negativos (9,8%) podemos afirmar que foram infecções primárias recentes, já que em infecções não-primárias o IgG anti-DENV seria detectado.

No caso das amostras IgG anti-DENV positivas e IgM anti-DENV negativo a prevalência foi de 43,6%, nestes casos podemos afirmar que estes doadores já foram previamente expostos ao DENV. Os doadores IgG e IgM anti-DENV negativos (56,4%) não foram infectados pelo DENV recente ou previamente, exceto nos casos dos doadores que tiveram resultado de qPCR positivos para DENV.

Ao analisar os resultados das sorologias somente das amostras qPCR positivas podemos observar que nenhum doador foi IgM anti-DENV positivo

provavelmente por estar no período de incubação ou por ser uma infecção aguda assintomática, sendo que 3 amostras apresentaram resultado negativo para IgG anti-DENV caracterizando uma infecção aguda primária e 4 foram positivas para IgG anti-DENV o que representa uma infecção aguda não-primária. Observando estes dados juntamente com resultados de outros trabalhos que também detectaram doadores virêmicos que também eram IgM anti-DENV negativos (38, 82, 85, 86) podemos concluir que a triagem por um marcador sorológico como o IgM não seria o ideal para detecção de doadores virêmicos e assintomáticos no banco de sangue visto que todos os doadores estariam no período de incubação ou de janela imunológica. Como citado anteriormente, uma das limitações mais importantes destes testes sorológicos seria a reação cruzada com ZIKV, porém este dado não é relevante para este trabalho já que esta casuística foi obtida no ano de 2013 no período antes da introdução do ZIKV no Brasil (102).

Quanto a comparação de resultados de qPCR e sorologia dos doadores (casos assintomáticos) com os casos sintomáticos (dados SINAN) ilustrada no Gráfico 3 podemos observar que o IgM anti-DENV está positivo em 15,95% dos doadores no mês de março e 17,98% no mês de abril. Essa positividade indica que estes doadores tiveram dengue provavelmente durante o pico da epidemia (janeiro ou fevereiro) ou durante o próprio mês de coleta já que o IgM anti-DENV pode positivar desde o quinto dia de doença assintomática e durar até 3 meses. Quanto a positividade de IgG anti-DENV, ela foi de 52,47% no mês de março e 53,96% no mês de abril. A maior positividade do qPCR no mês de abril mostra que apesar da diminuição de casos sintomáticos da doença o risco para transfusão de DENV continua e é maior do que o mês anterior, no qual há mais que 5,8 vezes de casos notificados da doença em comparação a abril.

A análise da positividade de IgG e IgM anti-DENV por semana (Gráfico 2) permitiu calcularmos a incidência de infecção por DENV na população de doadores de sangue no período estudado, que foi de 3,7% (semana 9 = 14,7%; semana 18 = 17,3%). Analisando este dado juntamente com o aumento da positividade de IgG anti-DENV podemos concluir que houve uma alta taxa de infecção prévia por DENV nessa população com apenas um pequeno acréscimo de infecções primárias durante o período analisado. Provavelmente a incidência verificada em nossa amostragem subestima a real incidência da epidemia. Isto provavelmente se deve ao início tardio da coleta de amostras se observado o período de pico da epidemia no ano de nossa

casuística. Nosso estudo foi desenhado para coleta de amostras no período geralmente de pico da epidemia (março e abril) mas, no ano de 2013 o pico da epidemia se deu de forma anômala em janeiro e fevereiro o que causou este viés em nosso cálculo de incidência.

Pudemos inferir que para cada 85,8 casos sintomáticos havia uma doação DENV RNA positiva, o que mostra o grande potencial de transmissão transfusional deste agente. O trabalho de Busch e cols. (93) foi realizado no ano de 2012 com 16.241 amostras de doadores da cidade do Rio de Janeiro coletados durante uma epidemia de DENV-4, mesmo sorotipo de nossa casuística. Nesse trabalho foi estimado que havia uma doação DENV RNA positiva para cada 800 casos sintomáticos notificados no período do trabalho com uma incidência calculada de 6,2% utilizando o marcador IgM anti-DENV. Fazendo-se a comparação de nosso trabalho com o de Busch e cols., pudemos concluir que apesar dos dois trabalhos terem sido realizados com uma casuística de doadores durante uma epidemia de DENV-4, no ano de 2012 a epidemia por DENV-4 no Brasil foi menor do que a de 2013, pois foi no começo da reintrodução do DENV-4 na região sudeste que foi identificado em estados desta região no fim de 2011 e foi o grande responsável pela epidemia de 2013, uma das maiores já registradas no país (67-69). Na cidade do Rio de Janeiro em 2012 o total de casos notificados foi de 130.412 casos numa população de 6.3 milhões de habitantes, perfazendo uma incidência de 2.070 casos/100.000 habitantes, já em Barretos no ano de 2013 a incidência foi 1,8 vezes maior com 3.836 casos/100.000 habitantes. Este pode ser um dos motivos pelo qual as taxas de frequência de doações virêmicas por casos sintomáticos da dengue diferem tanto, já que quanto maior o número de casos e incidência de casos de DENV maior a frequência de doações virêmicas encontradas como observamos também em outros trabalhos (85, 86, 90-92, 94, 103). Outra razão que pode contribuir para explicar esta discrepância nas taxas de incidência (3,7% *versus* 6,2%) e relação sintomático/assintomático (nosso trabalho apresentou uma taxa 9,3 vezes maior (85,8 *versus* 800)) seria a correção de cálculo feita no trabalho de Busch e cols. no número de casos sintomáticos reportados, a qual fez-se a exclusão de indivíduos que não estavam incluídos na faixa etária de doadores de sangue (18 a 65 anos) e, como não possuímos estes dados referentes a faixa etária dos casos sintomáticos em Barretos no período de nosso estudo, podemos ter o viés de indivíduos menores de 18 e maiores de 65 anos estarem inclusos no número de

casos reportados o que poderia levar a superestimação da proporção sintomáticos/assintomáticos.

Apesar de trabalhos demonstrarem que as taxas de viremia assintomáticas em doadores de sangue são proporcionais ao tamanho, incidência e ano das epidemias que ocorreram no ano de suas casuísticas (85, 86, 90-92), poucos casos de dengue transfusional com sintomas agudos e mais severos entre receptores foram documentados, e há algumas hipóteses para que ela não ocorra, como:

- A necessidade de infecção pelo vetor para aumentar a replicação viral e sua virulência, já que diversos trabalhos sugerem que a quantidade de vírus é menos importante do que a forma em que é apresentado ao sistema imune, uma vez que a quantidade de partículas virais transfundidas a um paciente por um hemocomponente contaminado é muito superior àquela transmitida pela picada do vetor. Já foi demonstrado que a estrutura das partículas virais muda de acordo com a temperatura do corpo (104), que difere entre mosquitos e seres humanos. Além disso, a saliva do mosquito injetada no hospedeiro contendo as partículas virais tem propriedades imunomoduladoras e antigênicas importantes (5, 105), juntamente com a replicação inicial em queratinócitos e células de *Langerhans* que pode fornecer acesso ao tecido linfóide e a medula óssea, onde a replicação viral se intensifica, o que não ocorre nos casos da doença desencadeados por transfusão;
- A presença de imunidade protetora em receptores em áreas endêmicas, já que nestas áreas a maioria da população já foi infectada por um ou mais sorotipos do DENV, como é o caso das cidades brasileiras de Recife e Rio de Janeiro, onde a soroprevalência na população adulta é pouco maior que 90% (106);
- Frequente co-transfusão de unidades de anticorpos anti-DENV que neutralizariam a infectividade de doações virêmicas (107);
- Falta de uma vigilância sistemática para tais eventos e difícil estabelecimento de uma relação de causa-efeito, pois a maioria das manifestações clínicas associados à dengue são comuns entre os receptores de sangue, incluindo febre, dor de cabeça e trombocitopenia e também porque em áreas endêmicas

a comprovação de que a doença foi adquirida por transfusão e não pelo vetor é um grande desafio (107).

A existência de casos de dengue transfusional em um país endêmico com grande número de casos e alta soroprevalência na população adulta como é o caso do Brasil contraria uma das hipóteses mais aceitas sobre gravidade de infecções não-primárias, a ADE. Já que a grande maioria da população já foi exposta a pelo menos um sorotipo de DENV e, portanto, possuiriam anticorpos não neutralizantes contra outros sorotipos restantes e, em conjunto com as altas taxas de viremia encontradas, a probabilidade de casos graves de dengue transfusional, seguindo a teoria do ADE, seria bastante alta o que difere dos relatos na literatura, onde poucos casos foram descritos e nenhum foi considerado como dengue grave.

Entre os hemoterapeutas, principalmente de regiões tropicais (108), tem havido um aumento na preocupação com a transmissão transfusional da dengue (109). O paralelo com a epidemia do WNV, que acometeu os Estados Unidos e Canadá a partir de 1999, é inevitável, lembrando que o WNV também é um flavivírus com transmissão por mosquitos. No caso do WNV, sua transmissão transfusional foi comprovada rapidamente e desde 2003 todo sangue doado nos EUA e Canadá é testado por biologia molecular para a identificação do RNA viral (110). Já em Porto Rico o NAT para DENV foram previamente implementada nos bancos de sangue do país após o relato de que uma receptora desenvolveu dengue grave (38) e mais recentemente a coleta de sangue foi interrompida por causa de um surto de outro arbovírus, o vírus chikungunya (CHKV), mesmo não havendo nenhum relato de transmissões deste vírus via transfusão de hemocomponentes (111), medida também tomada pelo governo da Itália (112). Em Portugal, após um surto de dengue na Ilha da Madeira, as autoridades implementaram a triagem por NAT para DENV para os doadores de sangue (113). Em Hong Kong, após o caso de dengue transfusional documentado em 2002, o Hong Kong Red Cross Blood Transfusion Service (BTS) intensificou o deferimento temporário de doadores em casos de viajantes que retornam de áreas de alta endemicidade (realizado também em alguns países não endêmicos) e também conscientizam os doadores a informar se desenvolveram sintomas como febre, dor de cabeça, dor retro orbital, mialgia, artralgia, vômitos ou erupção cutânea 2 semanas antes ou depois da doação (81, 114).

No entanto, o Brasil que atualmente tem o maior número de casos reportados de dengue no mundo, não possui quaisquer medidas específicas em relação a prevenção da dengue transfusional, mesmo já tendo casos comprovados no país (82, 85).

Os testes NAT já são utilizados nos bancos de sangue brasileiros na rotina da triagem sanguínea para doenças transmissíveis pelo sangue, como os vírus da hepatite B e C (HBC e HCV) e HIV (78) onde foi possível observar a importância de tal ferramenta prevenindo casos de potencial transmissão transfusional provinda de doadores em fase de janela imunológica, quando os métodos sorológicos são incapazes de detectar a infecção (55). Nesse sentido, e analogamente ao ocorrido com o WNV, no caso de uma implementação de triagem, esta deverá ser feita com testes NAT para detecção do RNA viral ao invés de testes que detectam anticorpos do tipo IgM que como observado neste trabalho não seria o marcador ideal devido ao período de janela imunológica; ou mesmo o antígeno viral NS1, utilizado em alguns países, principalmente pelo teste NS1 ter apresentado baixa sensibilidade em epidemias de Porto Rico (38, 40) e na cidade de Santos em 2010 (39).

Portanto, mais trabalhos sobre a dengue transmitida por transfusão são necessários para estipularmos e avaliarmos os riscos reais e as consequências da doença em certos receptores de hemocomponentes e também para possibilitar o desenvolvimento de ensaios sensíveis e apropriados à triagem de doadores de sangue. Com estes dados será possível à análise da conduta correta e mais rentável para sua prevenção.

Atualmente as propostas mais discutidas no mundo para diminuir e conter este risco são: evitar a coleta de sangue em regiões afetadas, aplicar métodos de redução de patógenos para concentrados de plasma e plaquetas e implementação de NAT e quarentena enquanto aguarda informações pós-doação da saúde do doador, porém a implementação de tais medidas depende muito da viabilidade financeira e política de cada país (115).

No caso do Brasil o deferimento de doadores que vivem em regiões afetadas não é viável. Quanto a possibilidade de implementação de um screening por NAT somente dos hemocomponentes que seriam transfundidos em pacientes com um maior risco de desenvolvimento da doença (risco ainda não estabelecido) ou de todas as doações (idealmente não só para o DENV, mas para todos os arbovírus passíveis de transmissão identificados no país) seria um custo muito alto e em um país como o

Brasil onde a verba investida nos programas de saúde são limitadas e que é endêmico e onde os casos reportados anualmente passam dos milhares o custo-benefício desta implementação não parece ser positivo e tais recursos têm maior custo-benefício quando aplicados em programas de combate ao mosquito que tem um maior impacto na prevenção de casos da doença (116).

A técnica ideal para a prevenção da dengue e outras doenças por agentes passíveis de transmissão transfusional futuramente seria a de inativação de patógenos, pois acredita-se que com maiores estudos, competição entre empresas, a depreciação da tecnologia com o tempo, dentre outros fatores, esta tecnologia teria seu custo reduzido e também seria eficiente na utilização em todos os hemocomponentes obtidos em uma doação (117-119). Com a utilização desta técnica as transfusões de sangue seriam muito mais seguras, pois a mesma seria útil não só para agentes comprovadamente passíveis de transmissão por transfusões (Ex.: DENV, ZIKV, HIV, HCV etc.) como também para agentes infecciosos emergentes que sequer foram identificados ainda, como por exemplo outros flavivírus e arbovírus aos quais o Brasil é muito suscetível.

8 CONCLUSÃO

Encontramos uma taxa de 0,38% de amostras positivas para DENV RNA, todas sorotipadas como DENV-4. A soroprevalência encontrada foi de 51,3% e a incidência de IgM anti-DENV foi de 16,8%. Esta incidência observada reflete a amplitude da epidemia na população geral e indica um alto risco de transmissão transfusional deste agente nessa ocasião.

9 ANEXOS

ANEXO A - Comprovantes de aprovação do projeto nos comitês de ética.

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

São Paulo, 26 de janeiro de 2017.

Parecer apresentado a Comissão de Ética e Pesquisa do Depto de Moléstias Infecciosas e Parasitárias em 26.01.17.

Título do Projeto: Dengue transfusional: estudo de doadores de sangue durante um surto na cidade de Barretos - SP, 2013 (Mestrado).

Pesquisador Responsável: José Eduardo Levi – Pesquisadora Executante: Nathália Caroline Santiago e Souza – Coautora: Vanessa Almeida Pádua.

Trata-se de estudo cujo objetivo principal é de estimar o risco de transmissão transfusional da dengue em doadores de sangue do Hemonúcleo do Hospital do Câncer de Barretos (HCB) durante um surto da doença na cidade de Barretos – SP em 2013.

Os objetivos secundários são:

1. Estimar a incidência de dengue na população de doadores de sangue do HCB.
2. Estimar a prevalência de marcadores de exposição à dengue e na população de doadores de sangue do HCB.
3. Determinar a prevalência dos sorotipos da dengue e a carga viral nos casos de doadores virêmicos.
4. Correlacionar os dados clínicos e laboratoriais dos receptores de hemocomponentes de doadores virêmicos para estimar o risco de transmissão transfusional da dengue.

Serão realizados os seguintes testes:

1. Pesquisa de anticorpos anti-DENV do tipo IgM (ELISA);
2. Pesquisa de anticorpos anti-DENV do tipo IgG (ELISA);
3. PCR em tempo real para detecção do RNA-dengue

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

4. Genotipagem do vírus da dengue

Serão estudadas 1822 amostras de plasma (1353) e soro (469) criopreservadas de doadores de sangue coletados no Hemonúcleo do HCB nos meses março e abril de 2013.

Aprovado.

A Comissão aprovou o presente projeto com base no parecer do relator.

Profº Drº Valdir Sabbaga Amato
Coordenador da Comissão de Ética e Pesquisa
do Depto de Moléstias Infecciosas e Parasitárias
da FMUSP

FUNDAÇÃO PIO XII - HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DENGUE TRANSFUSIONAL: ESTUDO DE DOADORES E RECEPTORES DE HEMOCOMPONENTES DURANTE UM SURTO NA CIDADE DE BARRETOS-SP.

Pesquisador: Vanessa Almeida Pádua

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 21135513.4.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 468.673

Data da Relatoria: 25/11/2013

Apresentação do Projeto:

Projeto muito bem escrito e de fácil entendimento, deixando claro o problema, o que se pretende atingir com o projeto e as abordagens metodológicas para tal.

O projeto apresenta o problema sobre o surto de dengue nos primeiros quatro meses do ano de 2103 na cidade de Barretos e como isso pode se relacionar com doadores e receptores de sangue, que foram submetidos a transfusão na Fundação Pio XII (Unidades I e II), acerca da dengue transfusional.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Principal

- Investigar a ocorrência e estimar o risco de transmissão transfusional da dengue durante uma epidemia.

Objetivos secundários

1. Estimar a incidência da dengue na população de doadores de sangue do HCB.
2. Estimar a prevalência de marcadores de exposição à dengue na população de doadores de sangue do HCB.
3. Determinar a prevalência dos sorotipos da dengue nos casos de doadores e receptores víricos.

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-6600

Fax: (17)3321-6629

E-mail: cep@hcanerbarretos.com.br

Continuação do Parecer: 468.673

4. Verificar sinais clínicos e laboratoriais que possam associar-se à dengue transfusional; com análise retrospectiva dos prontuários dos receptores de transfusões dengue RNA positivas e, grupo controle o qual recebeu sangue de doadoras dengue RNA negativas, avaliando cada sintoma que possa estar relacionado com o quadro clínico de dengue.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisadora descreve de forma satisfatória os riscos e benefícios para os sujeitos de pesquisa, como segue abaixo:

Riscos

Quebra accidental da confidencialidade dos dados dos doadores e receptores de sangue. Baseado em normas da Resolução nº 468/12, estará estabelecido o direito de confidencialidade de doadores e receptores de sangue.

Benefícios

O estudo não resultará em benefícios diretos, porém, após conclusões, poderá ser levantada a necessidade de instituir barreiras na dengue transfusional, ocasionando benefícios indiretos aos receptores de transfusão sanguínea.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nada a comentar

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos apresentados corretamente.

Recomendações:

Recomendo incluir a informação sobre a pendência abaixo apontada, que consta na carta de resposta da pesquisadora nos tópicos benefícios, pois o fato de orientar e informar os sujeitos de pesquisa será benéfico em um caso de segunda exposição ao vírus.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Em relação a pendência apontada anteriormente, segue:

CEP: o CEP entende após consulta a especialista em infectologia (ad hoc) que é recomendável a comunicação e orientação aos pacientes identificados como portadores de amostras positivas

Endereço: Rua Antenor Duarte Viçela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-6600

Fax: (17)3321-6629

E-mail: cep@hccancerbarretos.com.br

FUNDAÇÃO PIO XII - HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS

Continuação do Parecer: 468.673

ou que tenham recebido transfusão com sangue positivo. Existe o risco de maiores complicações numa nova exposição ao vírus e o paciente poderá estar mais atento a este risco, assim como seu médico na eventualidade de uma nova contaminação.

Resposta: A pesquisadora em carta de resposta a essa pendência descreve o seguinte - "Por se tratar de um estudo retrospectivo e o fato da dengue ser uma doença aguda, geralmente auto-limitada, mesmo após a identificação de um caso de dengue transfusional, não haverá intervenção clínica relacionada aos receptores e doadores de sangue. Contudo, todos os doadores RNA positivos e os receptores de hemocomponentes RNA positivos serão convocados para consulta médica, onde receberão as informações sobre os resultados dos exames, para que possam, de alguma maneira, se prevenir ou se alertarem para um potencial risco de gravidade com subseqüentes infecções por dengue..."

Conclusão: pendência atendida.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII e Hospital do Câncer de Barretos ANALISOU as pendências do referido projeto e decidindo que o mesmo encontra-se APROVADO.

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios parciais previstos para 26/05/2014.
2. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.
3. Este projeto está cadastrado no CEP-HCB sob o número 738/2013.

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-6600

Fax: (17)3321-6629

E-mail: cep@hccancerbarretos.com.br

FUNDAÇÃO PIO XII -
HOSPITAL DE CÂNCER DE
BARRETOS

Continuação do Parecer: 468.673

BARRETOS, 26 de Novembro de 2013

Assinador por:
Ednise Woyciechowski
(Coordenador)

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-6600

Fax: (17)3321-6629

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br

ANEXO B - Carta de aceite da agência de fomento.

2442774059509949

**TERMO DE ACEITAÇÃO DE APOIO FINANCEIRO
A PROPOSTA DE NATUREZA CIENTÍFICA, TECNOLÓGICA E/OU DE INOVAÇÃO**

Processo: 444961/2014-3

Título do Projeto: DENGUE TRANSFUSIONAL: ESTUDO DE DOADORES E RECEPTORES DE HEMOCOMPONENTES DURANTE UM SURTO NA CIDADE DE BARRETOS-SP, 2013

Instituição de Vínculo: Universidade de São Paulo/USP-SP

CNPJ: 63025530000104

Instituição de Execução: Universidade de São Paulo

CNPJ: 63025530000104

Chamada: MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 - Faixa B - até R\$ 60.000,00

Eu, José Eduardo Levi, 094.410.398-70, declaro conhecer, concordar e atender integralmente às exigências Nº CPF (ou PASSAPORTE, se estrangeiro) da Chamada acima especificada e às Condições Gerais para Apoio Financeiro que regem a concessão dos recursos especificados abaixo:

AUXÍLIO FINANCEIRO**Custeio:** R\$ 40.000,00**Valor Global:** R\$ 40.000,00

Tenho ciência:

- a) de que o prazo para utilização dos recursos financeiros começa a vigorar a partir da data da assinatura deste Termo de Aceitação, pelo período constante na Chamada correspondente; e
- b) das disposições legais e procedimentos para a adequada utilização de recursos financeiros e a correta prestação de contas (Manual de Utilização de Recursos Financeiros e Prestação de Contas).

1. DA CONCESSÃO:**1.1.** Ao aceitar o apoio financeiro, o BENEFICIÁRIO declara formalmente:

- a) dedicar-se às atividades pertinentes à proposta aprovada;
- b) observar o disposto nas Leis nº 8.666/93 e nº 10.973/04, nos Decretos nº 93.872/86 e nº 5.563/05 e na Lei nº 8.112/90, no que couber, bem como os demais instrumentos legais pertinentes;
- c) conhecer o Protocolo de Cooperação Técnica firmado entre a instituição de execução do projeto/plano de trabalho e o CNPq, publicado no Diário Oficial da União;
- d) conhecer e cumprir as exigências da Chamada à qual a proposta está relacionada, como também as normas do CNPq, ora em validade, relativas à modalidade de apoio financeiro aprovado, ciente que a eventual mudança dessas normas não afeta, altera ou incide sobre o presente documento, exceto quando proposta pelo CNPq e formalmente aceita pelo BENEFICIÁRIO;
- e) possuir anuência formal da instituição de execução do projeto/plano de trabalho, seja sob a forma de vínculo empregatício ou funcional ou, na ausência deste, sob a forma de declaração de autoridade institucional competente, segundo modelo disponível na página do CNPq na Internet;
- f) dispor das autorizações legais cabíveis de instituições como Instituto Brasileiro de Meio Ambiente - IBAMA, Fundação do

Nacional do Índio - FUNAI, Comitê de Ética na Pesquisa - CEP, Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, das Comissões de Ética em pesquisa com animais, Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN e outras, no caso em que a natureza do projeto, as exigir;

g) manter os documentos referidos nas alíneas "e" e "f" em seu poder até cinco anos após a aprovação final das contas do CNPq pelo Tribunal de Contas da União, não sendo necessária sua remessa ao CNPq;

h) ter ciência de que esta declaração é feita sob pena da incidência nos artigos [297-299 do Código Penal Brasileiro](#) sobre a falsificação de documento público e falsidade ideológica, respectivamente; e

i) estar ciente que o prazo para utilização dos recursos financeiros começa a vigorar a partir da data da assinatura do Termo de Aceitação, pelo período constante na Chamada correspondente, devendo ser aplicados exclusivamente para a proposta aprovada.

1.2. O BENEFICIÁRIO compromete-se, ainda, a:

a) responsabilizar-se pela adequada implementação e aplicação dos recursos financeiros aprovados, atendendo aos aspectos normativos definidos para a(s) modalidade(s) concedida(s), podendo estar previsto apenas recursos de capital e custeio, como também recursos para bolsas;

b) utilizar os recursos financeiros em acordo com os critérios e procedimentos estabelecidos no Manual de Utilização de Recursos Financeiros e Prestação de Contas ;

c) assumir todas as obrigações legais decorrentes de contratações eventuais necessárias à consecução do objeto, não tendo tais contratações qualquer vínculo com o CNPq;

d) apresentar, nos prazos que lhe forem determinados, informações ou documentos referentes tanto ao desenvolvimento quanto à conclusão do projeto ou plano de trabalho aprovado;

e) se necessárias, propor alterações ao projeto/plano de trabalho, sujeitas à prévia análise e autorização do CNPq, e de entidade co-financiadora quando for o caso, desde que não se altere o objeto do projeto/plano de trabalho, e não implique remanejamento de despesas entre rubricas (capital para custeio e vice-versa);

f) permitir e facilitar ao CNPq o acesso aos locais de execução do projeto/plano de trabalho, o exame da documentação produzida e a vistoria dos bens adquiridos;

g) apresentar o relatório técnico final das atividades desenvolvidas em até 60 (sessenta) dias após o término da vigência do projeto/plano de trabalho, via Plataforma Carlos Chagas;

h) apresentar a prestação de contas financeira em até 60 (sessenta) dias após o término da vigência do projeto/plano de trabalho, em conformidade com o disposto no Manual de Utilização de Recursos Financeiros e Prestação de Contas, via Plataforma Carlos Chagas; e

i) se necessário, solicitar prorrogação de prazo de execução do projeto/plano de trabalho, via Plataforma Carlos Chagas, no prazo mínimo de 30 (trinta) dias antes do término da vigência.

1.3. É vedado

a) utilizar o recurso financeiro para fins distintos dos aprovados originalmente na proposta, sendo permitidas despesas exclusivamente com itens financiáveis estabelecidos nas normas de bolsas e auxílios individuais do CNPq, convênios e/ou Chamadas;

b) transferir a terceiros as obrigações assumidas sem prévia autorização do CNPq;

c) executar despesas em data anterior à vigência do benefício; e

d) efetuar pagamento em data posterior à vigência do benefício, salvo se expressamente autorizado pela autoridade competente do CNPq e desde que o fato gerador da despesa tenha ocorrido durante a vigência do Termo de Aceitação. Despesas realizadas fora do prazo de aplicação dos recursos serão glosadas.

2. DA GUARDA E DOAÇÃO DOS BENS

2.1. O BENEFICIÁRIO e a instituição de execução do projeto responderão pela manutenção do bem em perfeito estado de conservação e funcionamento.

2.2. Em caso de roubo, furto ou outro sinistro envolvendo o bem, o BENEFICIÁRIO ou a instituição de execução do projeto, após a adoção das medidas cabíveis, deverá comunicar imediatamente o fato ao CNPq, por escrito, juntamente com a justificativa e a prova de suas causas, anexando cópia autenticada da Ocorrência Policial, se for o caso.

2.3. É vedada a transferência dos bens para outro local ou estabelecimento, sem prévia e expressa autorização do CNPq.

Todas as despesas decorrentes da transferência dos bens e os eventuais danos causados correrão por conta e risco do BENEFICIÁRIO e da instituição de execução do projeto.

2.4. A doação dos bens patrimoniais adquiridos com apoio financeiro do CNPq deverá ser efetuada conforme estabelecido em norma específica e com o disposto no Protocolo de Cooperação Técnica.

3. DA PROPRIEDADE INTELECTUAL / CRIAÇÃO PROTEGIDA

Caso os resultados do projeto ou o relatório em si venham a ter valor comercial ou possam levar ao desenvolvimento de um produto ou método envolvendo o estabelecimento de uma patente, a troca de informações e a reserva dos direitos, em cada caso, dar-se-ão de acordo com o estabelecido na Lei de Inovação, nº 10.973, de 2 de dezembro de 2004, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005 e pela RN-013/2008.

4. DAS PUBLICAÇÕES E DIVULGAÇÃO

4.1. Trabalhos publicados e sua divulgação, sob qualquer forma de comunicação ou por qualquer veículo, de resultados obtidos com recursos do projeto, deverão, obrigatoriamente, no idioma da divulgação, fazer menção expressa ao apoio recebido do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq - Brasil, bem como mencionar quaisquer outras entidades/órgãos financiadores, especialmente aqueles que participaram no apoio do projeto em conjunto com o CNPq.

4.2. Material de divulgação de eventos, impressos em geral, publicações e a publicidade relativa a eles, de trabalhos e atividades apoiadas ou financiadas pelo CNPq, deverão trazer a logomarca deste em lugar visível, de fácil identificação em escala e tamanho proporcionais à área de leitura. Esclarecimentos a respeito e os padrões a observar devem ser objeto de consulta prévia junto à área de comunicação social do CNPq (comunicacao@cnpq.br).

4.2.1. Os mesmos materiais de divulgação de eventos, impressos em geral, publicações e a publicidade relativa a eles deverão trazer a logomarca de outras entidades/órgãos financiadores, em lugar visível, de fácil identificação, e em escala e tamanho proporcionais à área de leitura. (NR)

4.3. As ações publicitárias atinentes a propostas financiadas com recursos da União deverão observar rigorosamente as disposições contidas no § 1º do art. 37 da Constituição Federal, como também aquelas consignadas em Instrução Normativa da Secretaria de Comunicação de Governo e Gestão Estratégica da Presidência da República.

5. DA DESISTÊNCIA E SUSPENSÃO

5.1. Quando o BENEFICIÁRIO desistir da execução do projeto/plano de trabalho, antes do seu início, os recursos serão devolvidos ao CNPq, com justificativa plausível da desistência, no prazo de 30 (trinta) dias de seu recebimento. A não observância desse prazo implicará a correção do valor originalmente concedido, na forma da legislação aplicável aos débitos da Fazenda Nacional.

5.2. O BENEFICIÁRIO deverá comunicar formalmente ao CNPq qualquer descontinuidade do plano de trabalho ou do projeto de pesquisa, acompanhada da devida justificativa. No prazo de 30 (trinta) dias da comunicação da descontinuidade, deverão ser apresentados o relatório técnico e a prestação de contas, como também deverá ser devolvido ao CNPq eventual saldo financeiro. A não observância desse prazo implicará a correção do valor originalmente concedido, na forma da legislação aplicável aos débitos da Fazenda Nacional.

5.3. A liberação dos recursos do apoio financeiro ao projeto/plano de trabalho, bem como de quaisquer outros benefícios aprovados pelo CNPq, será suspensa quando ocorrer uma das seguintes impropriedades, constatada, inclusive, por procedimentos de fiscalização realizados pelo CNPq, Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT, Secretaria Federal de Controle Interno - SFCI ou Tribunal de Contas da União - TCU:

- a) não comprovação da utilização adequada da parcela anteriormente recebida, na forma da legislação pertinente, quando solicitada;
- b) verificação de desvio de finalidade na utilização dos recursos ou dos bens patrimoniais adquiridos no projeto;
- c) atrasos não justificados no cumprimento das etapas ou fases programadas no projeto/plano de trabalho; e
- d) quando for descumprida qualquer condição deste instrumento.

5.3.1. A suspensão dos benefícios persistirá até a correção da causa verificada.

5.4. O BENEFICIÁRIO, cuja prestação de contas e relatório técnico final do projeto/plano de trabalho, com vigência expirada não forem aprovados, será considerado inadimplente e terá suspenso o pagamento de projetos/planos de trabalho, vigentes, bem como a concessão de novas modalidades de apoio, sem prejuízo de outras medidas julgadas necessárias pelo CNPq e previstas na lei.

6. DAS DISPOSIÇÕES FINAIS

6.1. As presentes condições gerais referem-se a proposta a ser financiada com recursos do CNPq. Se financiada com recursos de outras fontes, poderão prevalecer disposições específicas constantes em Chamadas, Convênios e outros regulamentos pertinentes.

6.2. O Termo de Aceitação só será válido na vigência do Protocolo de Cooperação Técnica firmado entre o CNPq e a instituição de execução do projeto/plano de trabalho, indicada pelo proponente na solicitação.

6.3. O apoio financeiro aprovado pelo CNPq não gera vínculo de qualquer natureza ou relação de trabalho, constituindo doação com encargos feita ao BENEFICIÁRIO.

6.4. O pessoal envolvido na execução do projeto/plano de trabalho, não possuirá vínculo de qualquer natureza com o CNPq e deste não poderá demandar quaisquer pagamentos, sendo estes de inteira responsabilidade do BENEFICIÁRIO/Instituição de execução do projeto/plano de trabalho, que o tiver empregado na sua execução.

6.4.1. Se eventualmente o CNPq for demandado pelo pessoal utilizado nos trabalhos, o BENEFICIÁRIO e a instituição de execução do projeto/plano de trabalho, o ressarcirão das despesas que em decorrência realizar, atualizadas monetariamente.

6.5. O processo somente será encerrado após as aprovações do relatório técnico final e da prestação de contas e desde que cumpridas todas as condições previstas neste instrumento e nas normas aplicáveis.

6.6. O descumprimento de qualquer condição constante deste instrumento e a inobservância de dispositivos legais aplicáveis implicará o encerramento imediato do apoio financeiro aprovado e obrigará o BENEFICIÁRIO a ressarcir integralmente o CNPq de todas as despesas realizadas, atualizadas nos termos da legislação, sem prejuízo da aplicação de penalidades cabíveis.

6.6.1. A recusa ou omissão do BENEFICIÁRIO, quanto ao ressarcimento de que trata este item, ensejará a consequente abertura de tomada de contas especial e a decorrente inscrição do BENEFICIÁRIO e do débito no Cadastro de Inadimplência Institucional - CADIN e do Tesouro Nacional.

6.7. O BENEFICIÁRIO reconhece que ao CNPq compete exercer a autoridade normativa de controle e fiscalização sobre a execução do projeto/plano de trabalho, bem como assumir ou transferir a responsabilidade pela mesma, no caso da paralisação ou de fato relevante que venha a ocorrer, de modo a evitar a descontinuidade das atividades.

7. ACEITE

Declaro ainda que li e aceitei integralmente os termos deste documento, comprometendo-me a cumpri-los fielmente, não podendo, em nenhuma hipótese, deles alegar desconhecimento.

Termo de aceitação registrado eletronicamente por meio da internet junto ao CNPq, pelo agente receptor 10.0.2.22(srv258.cnpq.br) , mediante uso de senha pessoal do Beneficiário em 02/12/2014, originário do número IP 200.130.33.73(200.130.33.73) e número de controle 1926938619269386:3787697507-3655057392.

Para visualizar este documento novamente ou o PDF assinado digitalmente, acesse: <http://efomento.cnpq.br/efomento/termo?numeroAcesso=2442774059509949>.

ANEXO C - Artigos publicados ou no prelo produzidos durante o período do mestrado.

Lancet Infect Dis. 2019 May 16. pii: S1473-3099(19)30125-2. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30125-2. [Epub ahead of print]

Predictors of mortality in patients with yellow fever: an observational cohort study.

Kallas EG¹, D'Elia Zanella LGFAB², Moreira CHV², Buccheri R³, Diniz GBF³, Castilheiras ACP³, Costa PR⁴, Dias JZC⁴, Marmorato MP⁴, Song ATW⁴, Maestri A⁴, Borges IC⁴, Joelsons D⁴, Cerqueira NB⁴, Santiago E Souza NC⁵, Morales Claro I⁴, Sabino EC⁴, Levi JE⁶, Avelino-Silva VI⁴, Ho YL⁴.

Author information

Abstract

BACKGROUND: Yellow fever virus infection results in death in around 30% of symptomatic individuals. The aim of this study was to identify predictors of death measured at hospital admission in a cohort of patients admitted to hospital during the 2018 outbreak of yellow fever in the outskirts of São Paulo city, Brazil.

METHODS: In this observational cohort study, we enrolled patients with yellow fever virus from two hospitals in São Paulo-the Hospital das Clínicas, University of São Paulo and the Infectious Diseases Institute "Emilio Ribas". Patients older than 18 years admitted to hospital with fever or myalgia, headache, arthralgia, oedema, rash, or conjunctivitis were consecutively screened for inclusion in the present study. Consenting patients were included if they had travelled to geographical areas in which yellow fever virus cases had been previously confirmed. Yellow fever infection was confirmed by real-time PCR in blood collected at admission or tissues at autopsy. We sequenced the complete genomes of yellow fever virus from infected individuals and evaluated demographic, clinical, and laboratory findings at admission and investigated whether any of these measurements correlated with patient outcome (death).

FINDINGS: Between Jan 11, 2018, and May 10, 2018, 118 patients with suspected yellow fever were admitted to Hospital das Clínicas, and 113 patients with suspected yellow fever were admitted to Infectious Diseases Institute "Emilio Ribas". 95 patients with suspected yellow fever were included in the study, and 136 patients were excluded. Three (3%) of 95 patients with suspected yellow fever who were included in the study were excluded because they received a different diagnosis, and 16 patients with undetectable yellow fever virus RNA were excluded. Therefore, 76 patients with confirmed yellow fever virus infection, based on detectable yellow fever virus RNA in blood (74 patients) or yellow fever virus confirmed only at the autopsy report (two patients), were included in our analysis. 27 (36%) of 76 patients died during the 60 day period after hospital admission. We generated 14 complete yellow fever virus genomes from the first 15 viral load-detectable samples. The genomes belonged to a single monophyletic clade of the South America I genotype, sub-genotype E. Older age, male sex, higher leukocyte and neutrophil counts, higher alanine aminotransferase, aspartate transaminase (AST), bilirubin, and creatinine, prolonged prothrombin time, and higher yellow fever virus RNA plasma viral load were associated with higher mortality. In a multivariate regression model, older age, elevated neutrophil count, increased AST, and higher viral load remained independently associated with death. All 11 (100%) patients with neutrophil counts of 4000 cells per mL or greater and viral loads of $5 \cdot 1 \log_{10}$ copies/mL or greater died (95% CI 72-100), compared with only three (11%) of 27 (95% CI 2-29) among patients with neutrophil counts of less than 4000 cells per mL and viral loads of less than $5 \cdot 1 \log_{10}$ copies/mL.

INTERPRETATION: We identified clinical and laboratory predictors of mortality at hospital admission that could aid in the care of patients with yellow fever virus. Identification of these prognostic markers in patients could help clinicians prioritise admission to the intensive care unit, as patients often deteriorate rapidly. Moreover, resource allocation could be improved to prioritise key laboratory examinations that might be more useful in determining whether a patient could have a better outcome. Our findings support the important role of the virus in disease pathogenesis, suggesting that an effective antiviral could alter the clinical course for patients with the most severe forms of yellow fever.

FUNDING: São Paulo Research Foundation (FAPESP).

Copyright © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Infectious Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijid INTERNATIONAL
SOCIETY
FOR INFECTIOUS
DISEASES

Short Communication

Evaluation of serological cross-reactivity between yellow fever and other flaviviruses

Nathalia Caroline Santiago e Souza^{a,b}, Alvina Clara Félix^a, Anderson Vicente de Paula^a, José Eduardo Levi^a, Claudio Sérgio Pannuti^a, Camila Malta Romano^{a,c,*}^a Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil^b Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil^c Hospital das Clínicas HCFMUSP (LIM52), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 November 2018

Received in revised form 7 January 2019

Accepted 10 January 2019

Corresponding Editor: Eskild Petersen, Aarhus, Denmark

Keywords:

Serological tests

Yellow fever

Dengue

Zika

Cross-reactivity

ABSTRACT

Objectives: This study was performed to determine whether neutralizing antibodies against yellow fever virus (YFV) generated by YFV vaccine could interfere in the specificity of dengue virus (DENV) and Zika virus (ZIKV) IgG ELISA tests.**Methods:** Seventy-nine pairs of serum samples (pre- and post-vaccination), collected during the years 1997–1998 from children with no history of yellow fever disease who had been vaccinated against YFV, were tested. The seroconversion post-vaccination was evaluated through plaque reduction neutralization test (PRNT), and four different commercial ELISA kits were used for the detection of DENV and ZIKV IgG antibodies.**Results:** A cross-reactivity rate of 3.9% with DENV IgG antibodies was found only with the Dengue Virus IgG Dx Select kit (Focus Diagnostics).**Conclusions:** As several countries have local transmission of multiple arboviruses, the absence of cross-reactivity or minimum cross-reactivity of YFV neutralizing antibodies with DENV and ZIKV antigens is a relevant finding, since the interpretation of sero-epidemiological investigations would be seriously impacted in many regions where YFV vaccination is mandatory.© 2019 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

In recent years, Brazil has experienced several epidemics caused by arboviruses, such as dengue virus (DENV serotypes 1–4), Zika virus (ZIKV), chikungunya virus (CHIKV), and yellow fever virus (YFV). In the past 2 years, the largest epidemic of sylvatic yellow fever in decades occurred in areas that were not considered at risk (Faria et al., 2018). As part of the response to this recent outbreak, federal and state authorities conducted mass vaccination campaigns against YFV, and the vaccination is now recommended and offered in 19 Brazilian states (Saúde, 2018b). Preliminary results from the mass yellow fever vaccination campaign have indicated that 8.8 million persons in São Paulo, 6.9 million persons in Rio de Janeiro, and 1.8 million persons in Bahia have been vaccinated (Saúde, 2018a).

As may occur with other flaviviruses, it is possible that the antibodies produced against YFV may cross-react with antibodies

against other viruses from the same genus, such as DENV or ZIKV, which are responsible for many outbreaks and are distributed across the country. In settings where routine or mass immunization against YFV is conducted, cross-reactions between yellow fever vaccine-induced antibodies and DENV and ZIKV ELISA IgG tests might significantly impact the results of sero-epidemiological surveys.

The aim of this study was to determine whether neutralizing antibodies against YFV generated by the yellow fever vaccine could interfere in the specificity of DENV and ZIKV IgG ELISA tests.

Methods

Serum samples

Archived serum samples containing vaccine-induced neutralizing antibodies against YFV were selected from a panel of serum samples maintained at the Laboratory of Virology of the Instituto de Medicina Tropical, USP, for arboviral serological studies. These samples were collected during a previous study (Stefano et al., 1999), from 9-month-old children vaccinated against yellow fever with

* Corresponding author at: Av. Dr Eneas de Carvalho Aguiar, 470, Instituto de Medicina Tropical de SP, Virologia, São Paulo, 05403-000 SP, Brazil.
E-mail address: cmromano@usp.br (C.M. Romano).

Zika virus infection among symptomatic patients from two healthcare centers in São Paulo State, Brazil: prevalence, clinical characteristics, viral detection in body fluids and serodynamics

Tania Regina Tozetto-Mendoza^{1,*}, Vivian Iida Avelino-Silva^{2,*}, Sílvia Fonseca³, Ingra Morales Claro², Anderson Vicente de Paula¹, Anna Sara Levin^{1,2}, Ester Cerdeira Sabino^{1,2}, Maria Cassia Mendes-Correa^{1,2}, Walter Manso Figueiredo⁴, Alvina Clara Felix¹, Nathalia C. Santiago Souza¹, Angela Aparecida Costa⁴, Marta Inenami⁴, Rosângela M. Gasparetto da Silva⁴, José Eduardo Levi¹, Camila Malta Romano¹, Glaucia Paranhos-Baccalà^{1,5}, Aluisio Cotrim Segurado^{1,2}, Philippe Mayaud^{1,6}

¹Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

²Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, São Paulo, São Paulo, Brazil

³Hospital São Francisco, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

⁴Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Serviço Especial de Saúde de Araraquara, Araraquara, São Paulo, Brazil

⁵Medical Diagnostic Discovery Department (MD3), bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France

⁶London School of Hygiene and Tropical Medicine, Faculty of Infectious and Tropical Diseases, London, United Kingdom

*These first authors contributed equally to this article

Correspondence to: Vivian Iida Avelino-Silva

Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 470, CEP 05403-000, São Paulo, SP, Brazil
Tel: +55 11 30617347

E-mail: viviansilva87@gmail.com

Received: 9 November 2018

Accepted: 4 February 2019

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) clinical presentation and frequency/duration of shedding need further clarification. Symptomatic ZIKV-infected individuals identified in two hospitals in São Paulo State, Brazil, were investigated regarding clinical characteristics, shedding in body fluids, and serodynamics. Ninety-four of 235 symptomatic patients (Site A: 58%; Site B: 16%) had Real-Time PCR-confirmed ZIKV infection; fever, headache and gastrointestinal symptoms were less frequent, and rash was more frequent compared to ZIKV-negative patients. Real-Time PCR in serum had worse performance compared to plasma, while urine had the highest sensitivity. Shedding in genital fluids and saliva was rare. IgM positivity was the highest <14 days after the symptoms onset (86%), decreasing >28 days (24%); IgG positivity increased >14 days (96%) remaining positive in 94% of patients >28 days. ZIKV prevalence varied importantly in two neighboring cities during the same transmission season. Urine Real-Time PCR can improve diagnostic sensitivity; serum testing is less useful. Accurate serological tests are needed to improve diagnosis and surveillance.

KEYWORDS: Zika virus. Differential diagnosis. Kinetics. Body fluids. Polymerase chain reaction. Real-Time Polymerase Chain Reaction. Serology. Brazil.

INTRODUCTION

In 2016, the World Health Organization (WHO) declared Zika virus (ZIKV) infection-related microcephaly and other neurological disorders a Public Health Emergency of international concern¹. Since early 2015, the geographic spread of ZIKV has been reported to increase in Brazil, with the potential for broader dissemination due to the lack of pre-existing exposure of populations, absence of effective preventive methods and widespread distribution of the transmitting *Aedes* mosquito vector²⁻⁶. Many reports have also shown that the infection can be transmitted from person to person through sexual contact, which could further increase the potential for ZIKV spreading⁷⁻¹³. However, while some studies have

External Quality Assessment for Zika Virus Molecular Diagnostic Testing, Brazil

Carlo Fischer, Celia Pedrosa,
Alfredo Mendrone Jr,
Ana Maria Bispo de Filippis,
Antonio Carlos Rosário Vallinoto,
Bergmann Moraes Ribeiro, Edison Luiz Durigon,
Ernesto T.A. Marques Jr., Gubio S. Campos,
Isabelle F.T. Viana, José Eduardo Levi,
Luciano Cesar Scarpelli,
Mauricio Lacerda Nogueira,
Michele de Souza Bastos,
Nathalia C. Santiago Souza,
Ricardo Khouri, Sanny M. Costa Lira,
Shirley Vasconcelos Komninakis,
Cécile Baronti, Rémi N. Charrel,
Beate M. Kümmerer, Christian Drosten,
Carlos Brites, Xavier de Lamballerie,
Matthias Niedrig, Eduardo Martins Netto,
Jan Felix Drexler

Author affiliations: German Centre for Infection Research, associated partner Charité—Universitätsmedizin, Berlin, Germany (C. Fischer, C. Drosten, J.F. Drexler); LAPI, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Salvador, Brazil (C. Pedrosa, C. Brites, E.M. Netto); Fundação Pro-Sangue/Hemocentro de São Paulo, São Paulo, Brazil (A. Mendrone Jr., J.E. Levi); Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil (A.M.B. de Filippis); Federal University of Pará, Belém, Brazil (A.C.R. Vallinoto); University of Brasília, Brasília, Brazil (B. Moraes Ribeiro); University of São Paulo, São Paulo (E.L. Durigon, J.E. Levi, N.C.S. Souza); Oswaldo Cruz Foundation, Pernambuco, Brazil (E.T.A. Marques Jr., I.F.T. Viana); Universidade Federal da Bahia, Salvador (G.S. Campos); Diagnósticos da América—DASA, São Paulo (J.E. Levi, L.C. Scarpelli); Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo (J.E. Levi, S.M.C. Lira); Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, Brazil (M.L. Nogueira); Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil (M. de Souza Bastos); Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil (R. Khouri); Federal University of São Paulo, São Paulo (S.V. Komninakis); Aix Marseille Université, Marseille, France (C. Baronti, R.N. Charrel, X. de Lamballerie); Assistance Publique-Hopitaux Marseille, Marseille (C. Baronti, R.N. Charrel, X. de Lamballerie); University of Bonn Medical Centre, Bonn, Germany (B.M. Kümmerer); Robert Koch Institute, Berlin, Germany (M. Niedrig)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2405.171747>

We conducted an external quality assessment of Zika virus molecular diagnostic tests in Brazil using a new Zika virus standard. Of 15 laboratories, 73% showed limited sensitivity and specificity. Viral load estimates varied significantly. Continuous quality assurance is required for adequate estimates of Zika virus–associated disease and determination of patient care.

The catastrophic Zika virus outbreak in the Americas has affected millions of persons. Brazil was the most affected country and reported ≈95% of all cases of suspected Zika virus–associated congenital disease (1). Limited sensitivity and specificity of tests hampers serologic detection of Zika virus–specific antibodies in tropical regions (2). Thus, real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) has been key for diagnosing acute Zika virus infection and for use in epidemiologic studies (3–5). However, Zika virus molecular diagnostic testing is challenged by short-term viremia and low viral loads (3).

A recent external quality assessment (EQA) in Europe revealed that 60% of laboratories need to improve molecular Zika virus detection (6). Laboratories in affluent countries conduct Zika virus diagnostic testing predominantly in travelers returning from tropical regions. In resource-limited settings to which multiple co-circulating arboviruses are endemic, the diagnostic demands differ entirely. To evaluate the diagnostic landscape in the region most affected by Zika virus, we performed an EQA of molecular Zika virus diagnostic testing in Brazil during 2017.

The Study

Fifteen laboratories from 7 Brazilian states participated in this study; these laboratories are spread across ≈2,500 km longitude, including the areas most affected during Brazil's Zika virus outbreak (1). Participants were university laboratories, hospital laboratories, federal research institutes supporting public health services, and a diagnostic testing company. We provided EQA panels to all laboratories. Each panel comprised 12 lyophilized samples containing inactivated full virus spiked into human plasma tested negative for arboviruses beforehand. The panel consisted of 4 Zika virus–positive specimens of 10^3 – 10^6 RNA copies/mL to assess sensitivity and determine viral load. Zika virus–negative specimens to assess specificity comprised dengue virus serotypes 2 and 4, Japanese encephalitis

SHORT COMMUNICATION

WILEY **JOURNAL OF
MEDICAL VIROLOGY**

Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection.

Alvina Clara Felix¹ | Nathalia C. Santiago Souza¹ | Walter M. Figueiredo² |
Angela A. Costa² | Marta Inenami² | Rosangela M.G. da Silva² |
José Eduardo Levi¹ | Claudio Sergio Pannuti¹ | Camila Malta Romano¹

¹ Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

² Serviço Especial de Saúde de Araraquara-SESA, Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, Brazil

Correspondence

CM Romano, Av. Dr Eneas de Carvalho Aguiar, 470, Instituto de Medicina Tropical de SP, Virologia, São Paulo, 05403-000, SP, Brazil.
Email: cmromano@usp.br

Several countries have local transmission of multiple arboviruses, in particular, dengue and Zika viruses, which have recently spread through many American countries. Cross reactivity among Flaviviruses is high and present a challenge for accurate identification of the infecting agent. Thus, we evaluated the level of cross reactivity of anti-dengue IgM/G Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) from three manufacturers against 122 serum samples obtained at two time-points from 61 patients with non-dengue confirmed Zika virus infection. All anti-dengue ELISAs cross reacted with serum from patients with acute Zika infection at some level and a worrisome number of seroconversion for dengue IgG and IgM was observed. These findings may impact the interpretation of currently standard criteria for dengue diagnosis in endemic regions.

KEYWORDS

cross reaction, dengue virus, serological tests, Zika virus

1 | INTRODUCTION

Dengue fever is caused by four phylogenetically related dengue viruses (DENV1-4) and represents a major public health problem in tropical and subtropical countries.¹ Although DENV has been reported in America for many decades, there has been a dramatic increase in the number and severity of dengue cases in the Americas in the last three decades.² Brazil is endemic for DENV and the co-circulation of the four serotypes caused larger and more severe outbreaks recently. Consequently, dengue seroprevalence nowadays in Brazil is high in some regions. For example, in Rio de Janeiro and Recife 90% of the blood donors are seropositive.³ Laboratory diagnosis of acute dengue is usually made by NS1 antigen capture tests and/or IgM detection on convalescent samples. When molecular tests are available, Real time PCR is used for diagnosis, determination of the viral load and virus typing.

As many countries in the Americas, Brazil has also concomitant transmission of other arboviruses that produce febrile illness with similar and confounding symptoms. Since 2015, at least nine arboviruses that cause disease in humans have been detected in Brazil: Dengue virus, Yellow Fever, Saint Louis encephalitis virus, Mayaro, Oropouche, West Nile (although there is only one report of

infection in humans so far), and more recently, Zika virus and Chikungunya virus.⁴

In 2015, Zika virus (ZIKV) was introduced in Brazil causing a large epidemic in the northeast region of the country.⁵ The virus rapidly spread to other regions and also other countries on the American continent (<https://www.cdc.gov/zika/geo/active-countries.html>). Given the recent spread of ZIKV and the evidence of serious Zika-associated congenital malformations in pregnant women, efforts have been made to develop sensitive and specific serologic assays to detect anti-ZIKV antibodies. But, due to serological cross reactivity among flaviviruses, current anti-ZIKV antibody assays do not reliably distinguish Zika from other flavivirus infections.⁶⁻⁹ Therefore, in areas where DENV and ZIKV circulate simultaneously, to diagnose ZIKV infection is a challenge and accurate diagnostic tests that distinguish between flaviviruses are critical for both clinical and surveillance purposes.

If, on the one hand, the cross reactivity between DENV and ZIKV in serological tests against ZIKV is well known,^{6,8,10} on the other the potential impact of such phenomenon between these two viruses in DENV commercially available Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) kits has not been adequately emphasized. Herein, we tested the cross reactivity of sera from patients with confirmed ZIKV infection against three distinct commercial anti-dengue immunoglobulin M and G ELISAs.

ORIGINAL ARTICLE

DETECTION OF HUMAN ANTI-ZIKA VIRUS IgG BY ELISA USING AN ANTIGEN FROM *in vitro* INFECTED VERO CELLS: PRELIMINARY RESULTS

Laura Masami SUMITA(1), Jaqueline Polizeli RODRIGUES(2), Noely Evangelista FERREIRA(1), Alvina Clara FELIX(1), Nathalia Caroline Santiago SOUZA(1), Clarisse Martins MACHADO(1) & Heitor Franco de ANDRADE JÚNIOR(2)

SUMMARY

Zika virus (ZKV) infection is a huge public health problem in Brazil because of the increased incidence of microcephaly in neonates from infected mothers. Detection of specific IgG antibodies in maternal serum samples constitutes an important approach for diagnosing ZKV infection and evaluating its relationship with neonatal microcephaly. However, as there is no serological test produced in Brazil to detect IgM and IgG antibodies against ZKV, we sought to examine specific IgG in serum samples from patients or suspected mothers to detect previous infection and to test for specificity with regard to flaviviral infections occurring in the same area. Brazilian Zika virus native antigens were obtained from infected Vero cell layers or free virions in the culture medium and then used in ELISA. We tested sera from eight ZKV RNA-diagnosed infected patients (ZKVR), seven neonates with microcephaly and their mothers after delivery (MM), 140 dengue virus IgM-positive (DM) and IgG (DG)-positive patients, and 100 yellow fever (YF)-vaccinated patients. According to the ELISA, ZKVR samples were mostly positive (7/8), and all the MM serum samples were positive for ZKV IgG (7/7). In contrast, cross-reactions for dengue or yellow fever-vaccinated patients were observed, including DM (48/95), DG (10/45) or YF (3/100) serum samples; however, these cross-reactions exhibited low antigen avidity so that 6 M urea largely removed this cross-reactivity, with only a few cross-reacting samples remaining (8/140). ELISA based on extracted virions was much more specific, with all ZKVR (8/8) and MM sera being positive for ZKV IgG (7/7) and only borderline cross-reactivity found for DM (6/95), DG (3/45) or YF (4/100)-vaccinated serum samples. This technique (ELISA) can identify specific IgG in ZKV-infected patients and may be helpful in diagnosing congenital infections after maternal RNA virus clearance or in epidemiological studies.

KEYWORDS: Zika virus; Dengue virus; Congenital infection; IgG; Serology; Avidity.

INTRODUCTION

Congenital infections are acute infections whose etiological agents cross the placental barrier, infecting the fetuses, preventing maternal immune cells from controlling the infections¹. Despite the control of acute infection in the mother, the agent usually causes several progressive lesions in the fetus because the fetal immune system is still developing². Unknown fetal lesions are mainly diagnosed by ultrasound imaging, which is improving but fails to detect minute early lesions³. Some congenital infections are treatable, such as toxoplasmosis, and huge efforts have been made to detect fetal infections as early as possible by applying several serological approaches to maternal serum samples so as to accurately date the infection, and thus estimating the gestation age at which the vertical transmission has taken place⁴. Most causative agents of congenital infections have a high prevalence and low morbidity in the general population, constituting a health problem when a pregnant woman

presents with acute infection⁵. Indeed, the immunity controlling these infections usually protects the mother and their fetuses, but this scenario typically requires screening of acute infections in a population with a large fraction of immune individuals, as for toxoplasmosis⁶. A specific IgG is a marker of a past contact with agents, and its detection only confirms a previous infection of the host. IgG avidity is a useful marker of recent acute infections such as rubella and toxoplasmosis, allowing the distinction between chronic non-pregnancy-related infections and acute infections. This approach is preferred over the specific IgM detection, which has lost efficiency due to the appearance on the market of highly sensitivity assays⁷.

Zika virus (ZKV) infection has become epidemic in Northeast Brazil⁸ and in the rest of the world due to the spread of the virus and the presence of *Aedes aegypti* mosquitoes, the most probable culicine vector⁹. Since December 2015, an increasing number of neonates with microcephaly has

(1) Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratório de Virologia, São Paulo, SP, Brasil.

(2) Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratório de Protozoologia, São Paulo, SP, Brasil.

Correspondence to: Jaqueline Polizeli Rodrigues, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo/USP, Laboratório de Protozoologia Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 470 Cerqueira Cesar 05403-000 São Paulo/SP, Brasil. Tel.: 55.11.30617010. E-mail: jaquepolizeli@gmail.com

In Press: PlosOne

bioRxiv preprint first posted online Apr. 9, 2019; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/603811>. The copyright holder for this preprint (which was not peer-reviewed) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under a [CC-BY 4.0 International license](#).

1 Modulated Zika virus NS1 conjugate offers advantages for accurate detection of Zika virus 2 specific antibody in double antigen binding and Ig capture enzyme immunoassays

3

4 Richard S Tedder^{1,2,3#a}, Steve Dicks^{1,2}, Samreen Ijaz^{1*}, Nathalia Caroline Santiago de Souza⁴,
5 Anderson Vincente de Paula⁴, Flavia Levy⁵, Raquel Medialdea-Carrera⁶, José Eduardo Levi⁴,
6 Claudio S Pannuti⁴, Patrícia Carvalho de Sequeira⁵, David W G Brown^{1,5}, Ines Ushiro Lumb^{1,2}

7 1. Blood Borne Virus Unit, Virus Reference Department, Public Health England, London, England

8 2. Microbiology Services, NHS Blood and Transplant, London, England

9 3. University College London, Gower Street, London, England

10 4. Virology Laboratory (LIM-HCFMUSP), Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São
11 Paulo, São Paulo, Brazil

12 5. Flavivirus Reference Laboratory, IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

13 6. National Institute for Health Research, Health Protection Research Unit in Emerging and
14 Zoonotic Infections, University of Liverpool, Liverpool, England

15 ^{#a} Current address: Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Imperial College
16 London, London, England.

17 * Corresponding author

18 e-mail: samreen.ijaz@phe.gov.uk

REFERÊNCIAS

1. Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3(4):376-96.
2. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. *Cell.* 2002;108(5):717-25.
3. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology.* 2005;3:13.
4. Angel RMd, Valle JR-d. Dengue Vaccines: Strongly Sought but Not a Reality Just Yet. *PLOS Pathogens.* 2013;9(10):e1003551.
5. Mores CN, Christofferson RC, Davidson SA. The Role of the Mosquito in a Dengue Human Infection Model. *Journal of Infectious Diseases.* 2014;209(suppl 2):S71-S8.
6. Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiology.* 2007;7:9-.
7. Chan M, Johansson MA. The Incubation Periods of Dengue Viruses. *PLOS ONE.* 2012;7(11):e50972.
8. Méndez F, Barreto M, Arias JF, Rengifo G, Muñoz J, Burbano ME, et al. Human and mosquito infections by dengue viruses during and after epidemics in a dengue-endemic region of Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2006;74(4):678-83.
9. Kraiselburd E, Gubler DJ, Kessler MJ. Quantity of dengue virus required to infect rhesus monkeys. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985;79(2):248-51.
10. Guabiraba R, Ryffel B. Dengue virus infection: current concepts in immune mechanisms and lessons from murine models. *Immunology.* 2014;141(2):143-56.
11. CDC. Laboratory Guidance and Diagnostic Testing | Dengue | CDC. 2019.
12. Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. *Nature Reviews Disease Primers.* 2016;2:16055.
13. Grange L, Unité de la Génétique Fonctionnelle des Maladies Infectieuses IP, France, URA3012 CNdIRS, France, Simon-Lorriere E, Unité de la Génétique Fonctionnelle des Maladies Infectieuses IP, France, URA3012 CNdIRS, France, et al. Epidemiological Risk Factors Associated with High Global Frequency of Inapparent Dengue Virus Infections. *Frontiers in Immunology.* 2014;5.
14. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013;496(7446):504-7.
15. Ranjit S, Kissoon N. Dengue hemorrhagic fever and shock syndromes*. *Pediatric Critical Care Medicine.* 2011;12(1):90-100.
16. Guilarde AO, Turchi MD, Jr JBS, Feres VCR, Rocha B, Levi JE, et al. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever among Adults: Clinical Outcomes Related to Viremia, Serotypes, and Antibody Response. *Journal of Infectious Diseases.* 2008;197(6):817-24.
17. Simmons CP, Farrar JJ, van Vinh Chau N, Wills B. Dengue. *New England Journal of Medicine.* 2012;366(15):1423-32.
18. de Alwis R, Williams KL, Schmid MA, Lai C-Y, Patel B, Smith SA, et al. Dengue Viruses Are Enhanced by Distinct Populations of Serotype Cross-Reactive Antibodies in Human Immune Sera. *PLOS Pathogens.* 2014;10(10):e1004386.
19. de Alwis R, Beltramello M, Messer WB, Sukupolvi-Petty S, Wahala WMPB, Kraus A, et al. In-Depth Analysis of the Antibody Response of Individuals Exposed to Primary Dengue Virus Infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2011;5(6):e1188.

20. Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *The Journal of experimental medicine*. 1977;146(1):201-17.
21. Montoya M, Gresh L, Mercado JC, Williams KL, Vargas MJ, Gutierrez G, et al. Symptomatic Versus Inapparent Outcome in Repeat Dengue Virus Infections Is Influenced by the Time Interval between Infections and Study Year. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2013;7(8):e2357.
22. Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Vazquez S, Halstead SB. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev Panam Salud Publica*. 2002;11(4):223-7.
23. Corbett KS, Katzelnick L, Tissera H, Amerasinghe A, de Silva AD, de Silva AM. Preexisting neutralizing antibody responses distinguish clinically inapparent and apparent dengue virus infections in a Sri Lankan pediatric cohort. *The Journal of infectious diseases*. 2015;211(4):590-9.
24. Aguiar M, Halstead SB, Stollenwerk N. Consider stopping dengvaxia administration without immunological screening. *Expert Review of Vaccines*. 2017;16(4):301-2.
25. Halstead SB. Dengvaxia sensitizes seronegatives to vaccine enhanced disease regardless of age. *Vaccine*. 2017;35(47):6355-8.
26. Flasche S, Jit M, Rodríguez-Barraquer I, Coudeville L, Recker M, Koelle K, et al. The Long-Term Safety, Public Health Impact, and Cost-Effectiveness of Routine Vaccination with a Recombinant, Live-Attenuated Dengue Vaccine (Dengvaxia): A Model Comparison Study. *PLoS medicine*. 2016;13(11):e1002181-e.
27. Saúde SdVe. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 15 de 2018. *Boletim Epidemiológico* [Internet]. 2018; (22).
28. Souza-Neto JA, Powell JR, Bonizzoni M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. *Infection, Genetics and Evolution*. 2019;67:191-209.
29. Brasil. Ministério da Saúde. Protocolo de investigação de óbitos por arbovírus urbanos no Brasil – Dengue, Chikungunya e Zika. In: Saúde SdVe, editor. Brasília: Ministério da Saúde; 2016.
30. Guzman MG, Harris E. Dengue. *The Lancet*. 2015;385(9966):453-65.
31. WHO/TDR. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: World Health Organization; 2009. Available from: <https://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>.
32. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol*. 2000;38.
33. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol*. 2002;40.
34. Lima MdRQ, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, de Filippis AMB, Limonta D, dos Santos FB. A New Approach to Dengue Fatal Cases Diagnosis: NS1 Antigen Capture in Tissues. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2011;5(5):e1147.
35. Guzman MG, Jaenisch T, Gaczkowski R, Ty Hang VT, Sekaran SD, Kroeger A, et al. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(8).

36. Lima MdRQ, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, dos Santos FB. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(7):e738-e.
37. Castro-Jorge LA, Machado PR, Favero CA, Borges MC, Passos LM, de Oliveira RM, et al. Clinical evaluation of the NS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of dengue virus infection in Brazil. *J Med Virol*. 2010;82(8):1400-5.
38. Matos D, Tomashek KM, Perez-Padilla J, Muñoz-Jordán J, Hunsperger E, Horiuchi K, et al. Probable and possible transfusion-transmitted dengue associated with NS1 antigen-negative but RNA confirmed-positive red blood cells. *Transfusion*. 2016;56(1):215-22.
39. Felix AC, Romano CM, Centrone CdC, Rodrigues CL, Villas-Boas L, Araújo ES, et al. Low Sensitivity of NS1 Protein Tests Evidenced during a Dengue Type 2 Virus Outbreak in Santos, Brazil, in 2010. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*. 2012;19(12):1972-6.
40. Stramer SLF, Gregory A, Boucher Cynthia, Miller Dave, Dickson Sandra S, Lenes Bruce A, et al. Comparing the Yield of Dengue Viremic Blood Donations using NS1 Antigen (Ag) and NAT. San Diego: AABB; 2011.
41. Duyen HT, Ngoc TV, Ha do T, Hang VT, Kieu NT, Young PR, et al. Kinetics of plasma viremia and soluble nonstructural protein 1 concentrations in dengue: differential effects according to serotype and immune status. *J Infect Dis*. 2011;203(9):1292-300.
42. Koraka P, Burghoorn-Maas CP, Falconar A, Setiati TE, Djamiatun K, Groen J, et al. Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. *J Clin Microbiol*. 2003;41.
43. Chien Y-W, Liu Z-H, Tseng F-C, Ho T-C, Guo H-R, Ko N-Y, et al. Prolonged persistence of IgM against dengue virus detected by commonly used commercial assays. *BMC infectious diseases*. 2018;18(1):156-.
44. OhAinle M, Balmaseda A, Macalalad AR, Tellez Y, Zody MC, Saborio S, et al. Dynamics of dengue disease severity determined by the interplay between viral genetics and serotype-specific immunity. *Sci Transl Med*. 2011;3(114):114ra28.
45. Elizabeth AH, Sutee Y, Philippe B, Vinh Chau N, Shamala DS, Delia AE, et al. Evaluation of Commercially Available Anti-Dengue Virus Immunoglobulin M Tests. *Emerging Infectious Disease journal*. 2009;15(3):436.
46. van Meer MPA, Mögling R, Klaasse J, Chandler FD, Pas SD, van der Eijk AA, et al. Re-evaluation of routine dengue virus serology in travelers in the era of Zika virus emergence. *Journal of Clinical Virology*. 2017;92:25-31.
47. Thomas SJ, Nisalak A, Anderson KB, Libraty DH, Kalayanarooj S, Vaughn DW, et al. Dengue plaque reduction neutralization test (PRNT) in primary and secondary dengue virus infections: How alterations in assay conditions impact performance. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2009;81(5):825-33.
48. Felix AC, Souza NCS, Figueiredo WM, Costa AA, Inenami M, da Silva RMG, et al. Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection. *Journal of Medical Virology*. 2017;89(8):1477-9.
49. Priyamvada L, Quicke KM, Hudson WH, Onlamoon N, Sewatanon J, Edupuganti S, et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(28):7852-7.
50. Hofmann WP, Dries V, Herrmann E, Gärtner B, Zeuzem S, Sarrazin C. Comparison of transcription mediated amplification (TMA) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for detection of hepatitis C virus RNA in liver tissue. *Journal of Clinical Virology*. 2005;32(4):289-93.
51. DORAK MT, editor. *Real-Time PCR*2012.

52. Huhtamo E, Hasu E, Uzcátegui NY, Erra E, Nikkari S, Kantele A, et al. Early diagnosis of dengue in travelers: Comparison of a novel real-time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology. *Journal of Clinical Virology*. 2010;47(1):49-53.
53. Callahan JD, Wu SJL, Dion-Schultz A, Mangold BE, Peruski LF, Watts DM, et al. Development and Evaluation of Serotype- and Group-Specific Fluorogenic Reverse Transcriptase PCR (TaqMan) Assays for Dengue Virus. *J Clin Microbiol*. 392001. p. 4119-24.
54. Pabbaraju K, Wong S, Gill K, Fonseca K, Tipples GA, Tellier R. Simultaneous detection of Zika, Chikungunya and Dengue viruses by a multiplex real-time RT-PCR assay. *J Clin Virol*. 2016;83:66-71.
55. Roth WK, Busch MP, Schuller A, Ismay S, Cheng A, Seed CR, et al. International survey on NAT testing of blood donations: expanding implementation and yield from 1999 to 2009. *Vox Sanguinis*. 2012;102(1):82-90.
56. Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(8):e1760.
57. Monaise M.O. Silva MSR, Igor A.D. Paploski, Mariana Kikuti, Amelia M. Kasper, Jaqueline S. Cruz, Tássia L. Queiroz, Aline S. Tavares, Perla M. Santana, Josélio M.G. Araújo, Albert I. Ko, Mitermayer Galvão Reis, and Guilherme S. RibeiroComments to Author. Accuracy of Dengue Reporting by National Surveillance System, Brazil - Volume 22, Number 2—February 2016 - Emerging Infectious Disease journal - CDC. EMERGING INFECTIOUS DISEASES. 2018;22(2).
58. Teixeira MG, Costa MdCN, Barreto F, Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2009;25:S7-S18.
59. Nogueira RMR, Araújo JMgd, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2007;22:358-63.
60. San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckennooghe A, Dayan GH, et al. The Epidemiology of Dengue in the Americas Over the Last Three Decades: A Worrisome Reality. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010;82(1):128-35.
61. Barcellos C, Lowe R. Expansion of the dengue transmission area in Brazil: the role of climate and cities. *Tropical Medicine & International Health*. 2014;19(2):159-68.
62. Osanai CH, Rosa AP, Tang AT, Amaral RSd, Passos AD, Tauil PL. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima Nota previa. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1998;25(1):53-4.
63. Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986;81(2):245-6.
64. Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Souza RW, Zagne SM, Schatzmayr HG. Dengue epidemic in the stage of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. *Epidemiol Infect*. 1993;111(1):163-70.
65. Nogueira RMR, Fiocruz RdJ, Brasil, Miagostovich MP, Fiocruz RdJ, Brasil, Filippis AMBd, Fiocruz RdJ, Brasil, et al. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(7):925-6.
66. Temporão JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, Azevedo Rdo SS, Nunes MRT, et al. Dengue Virus Serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 172011. p. 938-40.
67. Amâncio FF, Ferraz ML, Almeida MCdM, Pessanha JEM, Iani FCM, Fraga GL, et al. Dengue virus serotype 4 in a highly susceptible population in Southeast Brazil. *Journal of Infection and Public Health*. 2014;7(6):547-52.
68. Heringer M, Souza TMA, Lima MdRQ, Nunes PCG, Faria NRdC, de Bruycker-Nogueira F, et al. Dengue type 4 in Rio de Janeiro, Brazil: case characterization following its introduction in an endemic region. *BMC Infectious Diseases*. 2017;17(1):410.

69. Ortiz-Baez AS, Cunha MDP, Vedovello D, Colombo TE, Nogueira ML, Villabona-Arenas CJ, et al. Origin, tempo, and mode of the spread of DENV-4 Genotype IIB across the state of São Paulo, Brazil during the 2012-2013 outbreak. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2019;114:e180251-e.
70. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica (SE) 53 de 2014. In: Saúde SdVe, editor. 2015.
71. Brasil. Ministério da Saúde. Dengue: situação epidemiológica (de janeiro a abril de 2012). In: Saúde SdVe, editor. 2012.
72. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 , 2015. In: Saúde SdVe, editor.: Ministério da Saúde; 2016.
73. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. In: Saúde SdVe, editor. 2017.
74. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2017. In: Saúde SdVe, editor. 2018.
75. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. In: Saúde SdVe, editor. 2019.
76. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria Nº 158, de 04 de fevereiro de 2016 - DOU de 05/02/2016 (nº 25, Seção 1, pág. 37). In: MINISTRO GD, editor. BRASÍLIA: MINISTÉRIO DA SAÚDE; 2016.
77. Brasil. Ministério da Saúde. Técnico em hemoterapia. In: Saúde. SdGdTdEnSDdGdTn, editor. BRASÍLIA: MINISTÉRIO DA SAÚDE; 2013.
78. Andrea P, Kupek E, Genovez G, Martins JT, Barban GB. NAT yield for human immunodeficiency and hepatitis C viruses in Brazilian blood donors: preliminary results. *Transfusion Medicine*. 2015;25(2):125-7.
79. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Hemovigilância: manual técnico para investigação das reações transfusionais imediatas e tardias não infecciosas. BRASÍLIA: ANVISA; 2007. p. 124.
80. de Wazières B, Gil H, Vuitton DA, Dupond J-L. Nosocomial transmission of dengue from a needlestick injury. *The Lancet*. 351(9101):498.
81. Chuang V, Wong TY, Leung YH, Ma E, Law YL, Tsang O, et al. Review of dengue fever cases in Hong Kong during 1998 to 2005. *Hong Kong Med J*. 2008;14(3):170-7.
82. Levi JE, Nishiya A, Félix AC, Salles NA, Sampaio LR, Hangai F, et al. Real-time symptomatic case of transfusion-transmitted dengue. *Transfusion*. 2015;55(5):961-4.
83. Tambyah PA, Koay ESC, Poon MLM, Lin RVTP, Ong BKC. Dengue Hemorrhagic Fever Transmitted by Blood Transfusion. *New England Journal of Medicine*. 2008;359(14):1526-7.
84. Oh HB, Muthu V, Daruwalla ZJ, Lee SY, Koay ES, Tambyah PA. Bitten by a bug or a bag? Transfusion-transmitted dengue: a rare complication in the bleeding surgical patient. *Transfusion*. 2015;55(7):1655-61.
85. Sabino EC, Loureiro P, Lopes ME, Capuani L, McClure C, Chowdhury D, et al. Transfusion-Transmitted Dengue and Associated Clinical Symptoms During the 2012 Epidemic in Brazil. *Journal of Infectious Diseases*. 2015.
86. Stramer SL, Linnen JM, Carrick JM, Foster GA, Krysztof DE, Zou S, et al. Dengue viremia in blood donors identified by RNA and detection of dengue transfusion transmission during the 2007 dengue outbreak in Puerto Rico. *Transfusion*. 2012;52(8):1657-66.

87. Tan FL-S, Loh DLSK, Prabhakaran K. Dengue haemorrhagic fever after living donor renal transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2005;20(2):447-8.
88. Chye JK, Lim CT, Ng KB, Lim JMH, George R, Lam SK. Vertical Transmission of Dengue. *Clinical Infectious Diseases*. 1997;25(6):1374-7.
89. Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM, Kleinman S, Metzger PS, Gregory KR, et al. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion*. 2009;49:1S-29S.
90. Linnen JM, Vinelli E, Sabino EC, Tobler LH, Hyland C, Lee T-H, et al. Dengue viremia in blood donors from Honduras, Brazil, and Australia. *Transfusion*. 2008;48(7):1355-62.
91. Mohammed H, Linnen JM, Muñoz-Jordán JL, Tomashek K, Foster G, Broulik AS, et al. Dengue virus in blood donations, Puerto Rico, 2005. *Transfusion*. 2008;48(7):1348-54.
92. Dias LL, Amarilla AA, Poloni TR, Covas DT, Aquino VH, Figueiredo LTM. Detection of dengue virus in sera of Brazilian blood donors. *Transfusion*. 2012;52(8):1667-71.
93. Busch MP, Sabino EC, Brambilla D, Lopes ME, Capuani L, Chowdhury D, et al. Duration of Dengue Viremia in Blood Donors and Relationships Between Donor Viremia, Infection Incidence and Clinical Case Reports During a Large Epidemic. *Journal of Infectious Diseases*. 2016.
94. Lavezzo LC, Dos Santos Santana V, Terzian ACB, Mondini A, De Moraes Bronzoni RV, Sperança M, et al. Arboviruses in blood donors: a study in the Amazon region and in a small city with a dengue outbreak. *Transfusion Medicine*. 2010;20(4):278-9.
95. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução - RDC Nº 57, de 16 de dezembro de 2010. In: Sanitária ANdV, editor. 2010.
96. Anez G, Volkova E, Jiang Z, Heisey DAR, Chancey C, Fares RCG, et al. Collaborative study to establish World Health Organization international reference reagents for dengue virus Types 1 to 4 RNA for use in nucleic acid testing. *Transfusion*. 2017;57(8):1977-87.
97. Johnson BW, Chambers TV, Crabtree MB, Guirakhoo F, Monath TP, Miller BR. Analysis of the replication kinetics of the Chimerivax™-DEN 1, 2, 3, 4 tetravalent virus mixture in aedes aegypti by real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2004;70(1):89-97.
98. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 6º Boletim de Produção Hemoterápica (Hemoprod 2017). Brasília2018.
99. Lye DC, Archuleta S, Syed-Omar SF, Low JG, Oh HM, Wei Y, et al. Prophylactic platelet transfusion plus supportive care versus supportive care alone in adults with dengue and thrombocytopenia: a multicentre, open-label, randomised, superiority trial. *The Lancet*. 2017;389(10079):1611-8.
100. Petersen LR, Busch MP. Transfusion-transmitted arboviruses. *Vox Sanguinis*. 2010;98(4):495-503.
101. Añez G, Heisey DAR, Chancey C, Fares RCG, Espina LM, Souza KPR, et al. Distribution of Dengue Virus Types 1 and 4 in Blood Components from Infected Blood Donors from Puerto Rico. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(2):e0004445.
102. Massad E, Burattini MN, Khan K, Struchiner CJ, Coutinho FAB, Wilder-Smith A. On the origin and timing of Zika virus introduction in Brazil. *Epidemiology and Infection*. 2017;145(11):2303-12.
103. Faria NR, da Costa AC, Lourenco J, Loureiro P, Lopes ME, Ribeiro R, et al. Genomic and epidemiological characterisation of a dengue virus outbreak among blood donors in Brazil. *Sci Rep*. 2017;7(1):15216.
104. Rey FA. Dengue virus: Two hosts, two structures. *Nature*. 2013;497(7450):443-4.

105. Cox J, Mota J, Sukupolvi-Petty S, Diamond MS, Rico-Hesse R. Mosquito Bite Delivery of Dengue Virus Enhances Immunogenicity and Pathogenesis in Humanized Mice. *Journal of Virology*. 2012;86(14):7637-49.
106. Sabino, E., Loureiro, P., Lopes, M., et al. Dengue RNA Among Blood Donors and Recipients During Large Epidemics of Denv-4 in Rio de Janeiro and Recife, Brazil. *Vox Sanguinis*. 2013;105(S1).
107. Lanteri MC, Busch MP. Dengue in the context of “safe blood” and global epidemiology: to screen or not to screen? *Transfusion*. 2012;52(8):1634-9.
108. Wendel S, Levi JE. Dengue em doadores de sangue: necessitamos de triagem laboratorial no Brasil? *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2008;30:417-8.
109. Wilder-Smith A CL, Massad E, Wilson ME. Threat of Dengue to Blood Safety in Dengue-Endemic Countries - Volume 15, Number 1—January 2009 - *Emerging Infectious Disease journal - CDC*. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:8-11.
110. Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, Lanciotti RS, Page PL, Stramer SL, et al. Transmission of West Nile Virus through Blood Transfusion in the United States in 2002. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(13):1236-45.
111. Simmons G, Brès V, Lu K, Liss NM, Brambilla DJ, Ryff KR, et al. High Incidence of Chikungunya Virus and Frequency of Viremic Blood Donations during Epidemic, Puerto Rico, USA, 2014. *Emerging infectious diseases*. 2016;22(7):1221-8.
112. Liumbruno GM, Calteri D, Petropulacos K, Mattivi A, Po C, Macini P, et al. The Chikungunya epidemic in Italy and its repercussion on the blood system. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*. 2008;6(4):199-210.
113. Schmidt M, Geilenkeuser W-J, Sireis W, Seifried E, Hourfar K. Emerging Pathogens – How Safe is Blood? *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2014;41(1):10-7.
114. Halperin D, Baetens J, Newman B. The effect of short-term, temporary deferral on future blood donation. *Transfusion*. 1998;38(2):181-3.
115. M. Bloch E, Simon M, Shaz B. *Emerging Infections and Blood Safety in the 21st Century* 2016.
116. Levi JE, Brazil HIAESP, Brazil FPSHdSPSP. Arbovirus epidemics and blood safety in Brazil. *ISBT Science Series*. 2018;12(1):233-8.
117. Allain JP, Goodrich R. Pathogen reduction of whole blood: utility and feasibility. *Transfusion Medicine*. 2017;27(5):320-6.
118. Laughhunn A, Santa Maria F, Broult J, Lanteri MC, Stassinopoulos A, Musso D, et al. Amustaline (S-303) treatment inactivates high levels of Zika virus in red blood cell components. *Transfusion*. 2017;57(3pt2):779-89.
119. Aubry M, Laughhunn A, Santa Maria F, Lanteri MC, Stassinopoulos A, Musso D. Amustaline (S-303) treatment inactivates high levels of Chikungunya virus in red-blood-cell components. *Vox Sang*. 2018;113(3):232-41.