

Fernando Nivaldo de Oliveira

**Avaliação de arboviroses (Dengue, Zika vírus e Chikungunya) em  
doadores e receptores de transplante de células-tronco  
hematopoiéticas do HC-FMUSP**

São Paulo

2022

Fernando Nivaldo de Oliveira

**Avaliação de arboviroses (Dengue, Zika vírus e Chikungunya) em  
doadores e receptores de transplante de células-tronco  
hematopoiéticas do HC-FMUSP**

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

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Figueiredo Costa

São Paulo

2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Fernando Nivaldo de  
Avaliação de arboviroses (Dengue, Zika vírus e  
Chikungunya) em doadores e receptores de  
transplante de células-tronco hematopoiéticas do  
HC-FMUSP / Fernando Nivaldo de Oliveira. -- São  
Paulo, 2022.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.  
Orientadora: Sílvia Figueiredo Costa.

Descritores: 1.Arbovirus 2.Transplante de células-  
tronco hematopoiéticas 3.Transfusão 4.Dengue 5.Zika  
6.Chikungunya

USP/FM/DBD-349/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## SUMÁRIO

	<b>Pg.</b>
1	<b>INTRODUÇÃO ..... 09</b>
2	<b>ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS ..... 10</b>
3	<b>ARBOVIROSES E TRANSMISSÃO TRANSFUSIONAL ..... 13</b>
4	<b>ARBOVIROSES E POPULAÇÃO TRANSPLANTE ..... 17</b>
5	<b>RECOMENDAÇÃO DE <i>SCREENING</i> EM COMPONENTES SANGUÍNEOS 20</b>
6	<b>RECOMENDAÇÃO DE AVALIAÇÃO RECEPTOR E DOADOR TCTH ..... 21</b>
7	<b>JUSTIFICATIVA ..... 22</b>
8	<b>OBJETIVOS ..... 23</b>
9	<b>MATERIAL E MÉTODOS ..... 24</b>
10	<b>RESULTADOS ..... 29</b>
11	<b>DISCUSSÃO ..... 46</b>
12	<b>CONCLUSÃO ..... 55</b>
13	<b>ANEXOS ..... 56</b>
14	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 63</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADEM – Encefalomielite Disseminada Aguda

AL – Alagoas

BA – Bahia

BEAM – Carmustina, citarabina, etoposídeo e melfalano

BluFlu – Bussulfano com fludarabina

CarboVP – Carboplatina, vincristina e prednisona

CBV – Ciclofosfamida, carmustina e etoposídeo

CDC – Center for Disease Control

CE – Ceará

CHKV – Chikungunya

CMV – Citomegalovírus

DENV – Vírus da dengue

DM – Diabetes Mellitus

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

DRC – Doença Renal Crônica

EBV – Epstein-barr vírus

FMUSP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

GVHD – Doença do Enxerto contra Hospedeiro

HAART – Terapia Antiretroviral Altamente Eficaz

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

HC – Hospital das Clínicas

HCC – Hepatocarcinoma

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HPB – Hiperplasia Prostática Benigna

HSV – Herpes simplex vírus

HTLV – Vírus T-linfotrópico Humano

ICO – Insuficiência Coronariana

IgA – Imunoglobulina A

IgM – Imunoglobulina M

IgG – Imunoglobulina G

LLA – Leucemia Linfocítica Aguda

LMA – Leucemia Mielóide Aguda

LH – Linfoma Hodgkin

LNH – Linfoma não Hodgkin

MA – Maranhão

MEL – Melfalano

MG – Minas Gerais

MM – Mieloma Múltiplo

MS – Mato Grosso do Sul

OPAS – Organização Pan-americana de Saúde

PA – Pará

PE – Pernambuco

PR – Paraná

PI – Piauí

RJ – Rio de Janeiro

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SBTMO – Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea

SGB – Síndrome de Guillain-Barré

SC – Santa Catarina

SE – Sergipe

SP – São Paulo

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCTH – Transplante de células progenitoras hematopoiéticas

VHB – Vírus da Hepatite B

VHC – Vírus da Hepatite C

VZV – Varicela- zoster vírus

ZKV – Zika vírus

## RESUMO

Oliveira FN. Avaliação de arboviroses (Dengue, Zika vírus e Chikungunya) em doadores e receptores de transplante de células-tronco hematopoiéticas do HC-FMUSP [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Nesta dissertação, dado ao fato do Brasil apresentar elevada prevalência de arboviroses, especialmente Dengue (DENV), Zika (ZKV) e Chikungunya (CHKV) e possuírem a forma vetorial como sua principal transmissão, porém, podem ser transmitidas também associada à transfusão de produtos sanguíneos, avaliou-se a transmissão destes agentes infecciosos por meio de transfusão sanguínea. Sabemos que a população de transplantados de células tronco-hematopoéticas (TCTH) está frequentemente exposta a estes agentes infecciosos, seja pela necessidade frequente de transfusão de hemocomponentes, seja pela presença vetorial endêmica em nosso país. Os resultados incluíram 93 pacientes durante o período realizado. A idade média foi de 52 anos e houve predominância de indivíduos do sexo masculino (56,9%). Foram considerados 5 (5,3%) casos positivos por meio da sorologia na nossa amostra populacional. Todos estes decorreram de soroconversão. Nenhum caso apresentou RT-PCR positivo. Todos os hemocomponentes investigados apresentaram RT-PCR de arboviroses negativos, evidenciando baixa prevalência de transmissão transfusional destes agentes na nossa população estudada.

Palavras-chave: Arbovírus. Transplante de células-tronco hematopoiéticas. Transfusão. Dengue. Zika. Chikungunya.



## **ABSTRACT**

Oliveira FN. Evaluation of arbovirus (Dengue, Zika virus and Chikungunya) in donors and recipients of hematopoietic stem cell transplantation [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

In this dissertation, given the fact that Brazil has a high prevalence of arboviruses, especially Dengue (DENV), Zika (ZKV) and Chikungunya (CHKV) and have the vector form as their main transmission, however, they can also be transmitted associated with the transfusion of blood products, the transmission of these infectious agents through blood transfusion was evaluated. We know that the hematopoietic stem cell (HSCT) transplant population is frequently exposed to these infectious agents, either because of the frequent need for blood components transfusion or because of the endemic vector presence in our country. The results included 93 patients during the period performed. The mean age was 52 years and there was a predominance of males (56.9%). Five (5.3%) cases were considered positive by serology in our population sample. All of these resulted from seroconversion. No case was RT-PCR positive. All investigated blood components showed negative RT-PCR of arboviruses, showing a low prevalence of transfusional transmission of these agents in our studied population.

Keywords: Arbovirus. Hematopoietic stem cell transplantation. Transfusion. Dengue. Zika. Chikungunya.

# 1. INTRODUÇÃO

Em decorrência da mudança climática, urbanização progressiva e constante, crescimento populacional, globalização, alterações genéticas virais bem como redução nas medidas de controle dos vetores, tem-se notado a emergência e reemergência das arboviroses em vários locais do mundo.

As arboviroses são compostas por vários vírus que compartilham como característica comum a transmissão mediada por artrópodes, principalmente mosquitos hematófagos. No contexto epidemiológico brasileiro, dado o clima tropical e subtropical existente, os arbovírus de maior circulação são o vírus da dengue (DENV), o zika vírus (ZKV), o chikungunya (CHKV) e o vírus da febre amarela.

Entre estas doenças, a nível mundial, a causada pelo DENV é a mais prevalente. Estima-se que seja endêmica em mais de 100 países, cursando todos os anos com mais de 100 milhões de casos e aproximadamente 25.000 óbitos<sup>1</sup>.

O impacto desta co-circulação viral em nosso país ainda é muito pouco conhecido, entretanto, agravos na morbidade e mortalidade se intensificam à medida que extensas epidemias reemergem, promovendo um grande número de indivíduos acometidos, aparecimento de casos graves, principalmente diante da ausência de um tratamento específico, além de medidas efetivas de prevenção e controle.

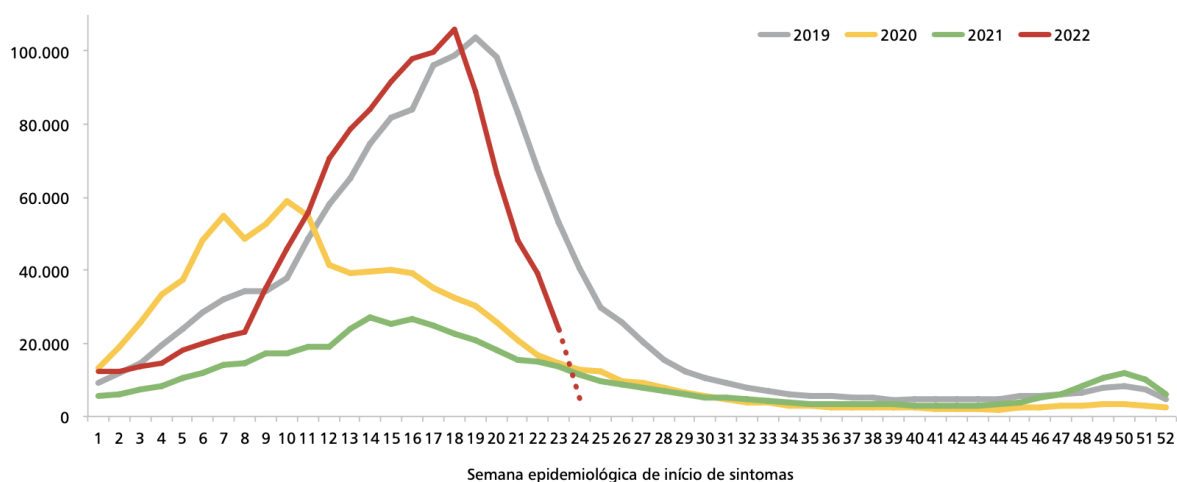
## 2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS ARBOVIROSES NO BRASIL

Até a semana epidemiológica 24 de 2022<sup>2</sup>, ocorreram 1.172.882 casos prováveis de dengue em nosso país, apresentando uma taxa de incidência de 549,8 casos para cada 100.000 habitantes. Comparativamente ao ano de 2021, no mesmo período, houve um aumento de 195,9% de casos. Em nosso país, a região com maior taxa de incidência DENV é a centro-oeste, apresentando uma taxa de 1.629,9 casos para cada 100.000 habitantes; seguida pela região sul com 983,9 casos para cada 100.000 habitantes; e sudeste, com 440,7 casos a cada 100.000 habitantes.

Até a mesma semana epidemiológica, foram reportados 585 óbitos por este agente em nosso país, sendo a maioria confirmado laboratorialmente (491 casos).

A figura 1 mostra a curva epidêmica dos casos prováveis de dengue, de acordo com as semanas epidemiológicas de início de sintomas de 2019 a 2022.

**Figura 1.** Curva epidêmica de casos prováveis de Dengue



Fonte: Sinan Online (banco de dados atualizado em 20/6/2022). Dados sujeitos à alteração.  
\*Dados referentes a SE 24.

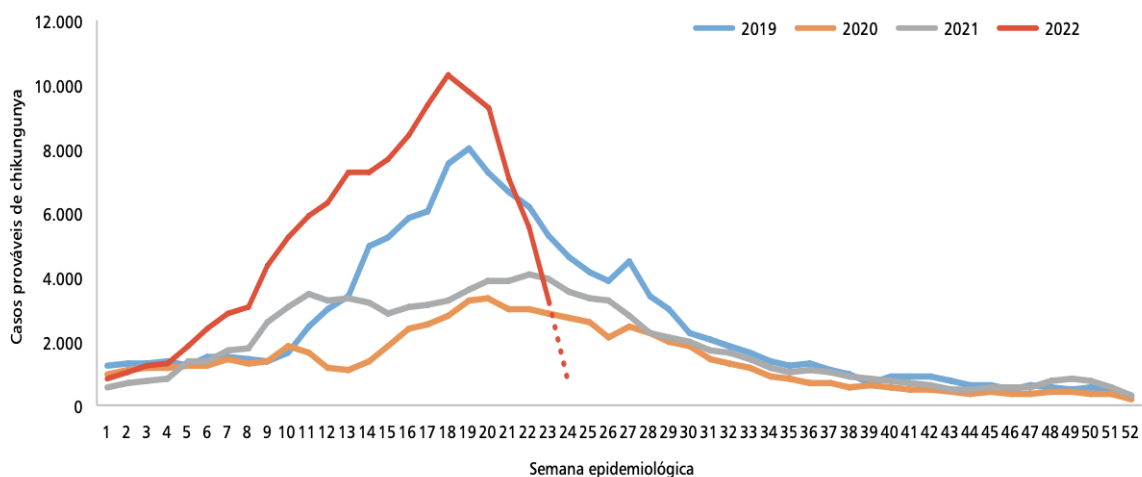
Quando analisados os dados da mesma patologia no município de São

Paulo, em 2022 o coeficiente de incidência foi de 91,99 casos para cada 100.000 habitantes, com 1 óbito reportado<sup>3</sup>.

Com relação aos casos de chikungunya, até a semana epidemiológica 24 de 2022, ocorreram 122.075 casos prováveis, apresentando uma taxa de incidência de 57,2 casos para cada 100.000 habitantes, ficando aquém dos dados epidemiológicos reportados pelo DENV. Comparativamente ao ano de 2021, neste mesmo período, houve um aumento de 93,7% de casos. Diferentemente do observado para dengue, a região que apresenta a maior taxa de incidência de chikungunya é a nordeste, com 175,7 casos para cada 100.000 habitantes; seguida pela centro-oeste com 28,8 casos para cada 100.000 habitantes. Até esta mesma semana epidemiológica, houve 23 óbitos confirmados por este agente<sup>2</sup>.

A figura 2 mostra a curva epidêmica dos casos prováveis de chikungunya, de acordo com as semanas epidemiológicas de início de sintomas de 2019 a 2022.

**Figura 2.** Curva epidêmica de casos prováveis de Chikungunya



Fonte: Sinan Online (banco de dados atualizado em 20/6/2022). Dados sujeitos à alteração.

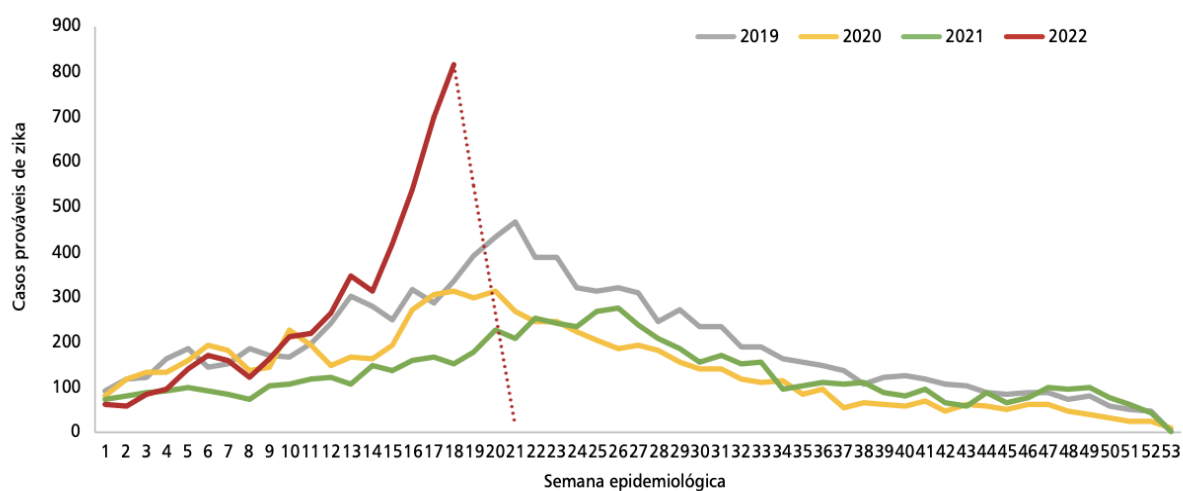
\*Dados referentes a SE 24.

Quando analisados os dados de CHKV do município de São Paulo, em 2022 o coeficiente de incidência foi de apenas 8 casos para cada 100.000 habitantes, com nenhum óbito reportado<sup>3</sup>.

Já a infecção por zika vírus, apresenta menor prevalência atualmente em nosso país. Até a semana epidemiológica 21 de 2022, ocorreram 5.699 casos prováveis, apresentando uma taxa de incidência de 2,7 casos para cada 100.000 habitantes; ficando bem abaixo dos dados reportados pelas outras 2 arboviroses. A região com maior taxa de incidência, semelhante ao observado pelo CHKV, é a Nordeste com 7,6 casos para cada 100.000 habitantes. Comparativamente ao ano de 2021, no mesmo período, houve um aumento de 118,9% de casos. Até o mesmo período de 2022, não houve óbito confirmado por esta patologia em nosso país<sup>2</sup>.

A figura 3 mostra a curva epidêmica dos casos prováveis de ZKV, de acordo com as semanas epidemiológicas de início de sintomas de 2019 a 2022.

**Figura 3.** Curva epidêmica de casos prováveis de Zika vírus



Fonte: Sinan NET (banco de dados atualizado em 31/5/2022). Dados sujeitos à alteração.  
\*Dados referentes a SE 21.

Já com relação aos casos de infecção por zika vírus no município de São Paulo, desde 2018 não existem casos de infecção aguda reportados<sup>3</sup>.

### 3. ARBOVIROSES E TRANSMISSÃO TRANSFUSIONAL

Apesar da principal forma de transmissão destas doenças, conforme mencionado anteriormente ser a vetorial, a possibilidade da transmissão por via transfusional já foi bem documentada na literatura. Muitos patógenos podem ser transmitidos por sangue e por produtos sanguíneos, o que traz uma grande preocupação na medicina transfusional<sup>4</sup>.

O risco acaba tendo um impacto maior pelo fato de que doadores de sangue assintomáticos infectados com estes agentes, em áreas endêmicas, podem servir como possível veículo para esta transmissão<sup>1</sup>.

É estimado que 53 a 87% dos pacientes infectados por arbovírus sejam assintomáticos e que possam ser potenciais doadores de sangue. Estudos realizados durante surtos e utilizando modelos matemáticos demonstraram que o risco de transmissão varia de acordo com a prevalência do arbovírus na população estudada e a situação endêmica ou de surto do país analisado.

O risco de transmissão transfusional do DENV foi reforçado através de estudo que demonstrou a viabilidade do vírus em hemocomponentes. Foram inoculadas  $10^5$ - $10^6$  unidades/mL do vírus nestes hemocomponentes que foram armazenados de acordo com o protocolo do banco de sangue local. Os autores demonstraram a persistência do RNA do vírus em plaquetas (7 dias em temperatura de 20 a 24°C) e em hemácias (42 dias em temperatura de 1 a 6°C). O vírus permaneceu positivo ao longo do armazenamento, apesar de decaimento logarítmico<sup>5,6</sup>.

Dados de Porto Rico de triagem de doadores de sangue durante surtos ocorridos em 2005, 2007, 2010, 2011 e 2012 demonstraram que a detecção de RNA do DENV variou de 0,03 a 0,31%<sup>7,8</sup>.

Estudo prospectivo realizado com 178 doadores assintomáticos na Índia, país considerado também endêmico para este vírus, encontrou 21 hemocomponentes (11,2%) positivos para a imunoglobulina M (IgM) de DENV e 1 (0,6%) positivo para o antígeno NS1<sup>9</sup>.

Publicação realizada com 500 doadores de sangue em uma cidade rural no Egito, país com probabilidade intermediária de infecção para o DENV, não encontrou presença de IgM, imunoglobulina G (IgG) e NS1 nos compostos sanguíneos, apesar de 10% desta população doadora ter reportado antecedente de exposição ao agente infeccioso. O que pode ter contruído para este achado

é a metodologia rápida empregada para o *screening*, que apresenta limitada sensibilidade de detecção<sup>1</sup>.

Com relação a descrição da transmissão destes agentes por transfusão, os primeiros 3 casos descritos de DENV ocorreram em 2002, em Hong Kong. A seguir, em 2008, foi também relatada a transmissão em Singapura para 2 pacientes. Mais recentemente, 2 casos de infecção pelo DENV foram descritos, um no Brasil e outro também em Cingapura<sup>6,10,11</sup>.

O primeiro caso de dengue transfusional descrito em nosso país ocorreu durante uma epidemia da doença na cidade de São Paulo, na qual um doador de plaquetas informou ao banco de sangue ter sido diagnosticado com DENV alguns dias após a doação. As plaquetas foram transfundidas para 2 pacientes, sendo que um deles foi hospitalizado 3 dias após a transfusão com quadro de febre e alta carga viral para DENV, comprovando a transmissão transfusional<sup>10</sup>.

Estudo conduzido por Sabino e colaboradores em 2 grandes cidades brasileiras, Recife e Rio de Janeiro, também demonstrou de forma convincente a transmissão transfusional de DENV tipo 4<sup>12</sup>. Seis pacientes foram identificados entre 10 pacientes susceptíveis, expostos a hemocomponentes virêmicos. A taxa de transmissibilidade foi de 37,5%. A transmissão ocorreu independentemente da carga viral do agente. Todos os 3 hemocomponentes (plasma, hemácias e plaquetas) foram capazes de transmitir DENV-4.

Os autores conduziram um outro estudo de caso-controle e não demonstraram diferença significativa dos sintomas da dengue (febre e fenômenos hemorrágicos), tempo de internação e sobrevida dos pacientes. As taxas globais deste estudo foram de 0,51% no Rio de Janeiro e 0,80% em Recife, e são superiores às relatadas em estudos anteriores no Brasil, Porto Rico e em Honduras<sup>12</sup>.

A transmissão da infecção por ZKV, a exemplo da por DENV, também apresenta aspectos que favorecem a sua ocorrência por via parenteral através de produtos sanguíneos, tais como: o agente pode estar presente no sangue de doador saudável, é infeccioso por rota parenteral e sobrevive aos processamentos e condições de estocagem<sup>13</sup>.

A prevalência da infecção assintomática em doadores de sangue durante epidemias tende a ser elevada<sup>14</sup>.

Estudo brasileiro detectou a presença de RNA de ZKV em 2,7% das amostras testadas aleatoriamente em um banco de sangue, na cidade de

Ribeirão Preto. A carga viral das 37 amostras positivas variou de 135 a 124.220 cópias/ml. Entre estas amostras, apenas 6 também foram positivas para a sorologia anti-ZKV IgM e IgG. Não ocorreu nenhum caso de transmissão por transfusão<sup>14</sup>.

Em 2013, na Polinésia Francesa, a presença do ZKV foi confirmada em 2,8% de doadores de sangue assintomáticos e a transmissão por transfusão de hemocomponentes foi reportada no Brasil<sup>4,15,16,17</sup>.

Em nosso país, a transmissão transfusional por ZKV ocorreu através da transfusão de plaquetas leucodepletadas de uma pessoa assintomática. A doação ocorreu no dia 16 de janeiro de 2016. Dois dias após a doação, o doador entrou em contato com o banco de sangue informando que iniciou com um quadro de rash corporal difuso e pruriginoso, associado a dor retroorbitária e artralgia. Este doador teve confirmação laboratorial de infecção por ZKV através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). O primeiro paciente receptor foi uma mulher de 54 anos com mielofibrose primária que teve PCR para ZKV positivo 6 dias após receber o hemocomponente; enquanto que o segundo era uma jovem de 16 anos com leucemia mielóide aguda (LMA) que teve o PCR para ZKV positivo 23-56 dias após a transfusão.

Nenhum receptor desenvolveu sintomatologia clínica. A análise do genoma viral identificou que o ZKV do doador e dos 2 receptores estavam filogeneticamente relacionados, confirmando assim a transmissão transfusional<sup>18</sup>.

Outro caso semelhante também foi descrito<sup>19</sup>. Um doador assintomático contactou o banco de sangue 3 dias após realizar a doação, referindo estar apresentando sintomas febris. O ZKV foi detectado por PCR da amostra de sangue armazenada da doação. Um concentrado de plaquetas proveniente desta doação foi transfundido em um paciente de 55 anos que estava internado para realizar transplante hepático ortotópico em decorrência de hepatite B e hepatocarcinoma (HCC). O PCR para ZKV e a análise do isolamento viral através de cultura de células foram positivos na amostra sanguínea coletada 4 dias após a transfusão. A análise por sequenciamento genômico também revelou 99,8% de homologia entre os 2 vírus isolados.

Estudos de prevalência de CHKV realizados durante surtos demonstraram que 3 a 28% das pessoas infectadas são assintomáticas e são potenciais disseminadores através da transmissão associada à transfusão<sup>20,21,22</sup>.



No entanto, os perfis virêmicos de pacientes assintomáticos com CHKV, que é o principal determinante do risco de transmissão por transfusão, ainda permanecem desconhecidos.

Um modelo probabilístico usou informações locais para estimar o risco semanal de transmissão de CHKV associado com transfusão durante a epidemia de 2009 na Tailândia. O risco de doações de indivíduos virêmicos por 100.000 variou de 38,2 a 52,3. O risco potencial de CHKV associado à transfusão por 100.000 foi de 1 em 2.429 doações (0.04%;95%IC, 1-66)<sup>23</sup>.

Diferentemente do reportado para DENV e ZKV, até o presente momento não existe publicação que confirme a transmissão transfusional por CHKV.

Importante destacar que a carga viral de ZKV e DENV necessária para causar infecção por transfusão ainda é desconhecida. Também é desconhecido se a presença de anti-IgM e anti-IgG concomitante com RNA viral reduz a transmissão de ZKV e DENV por transfusão sanguínea.

Além disso, o status sorológico do receptor também é importante, e é possível que a presença de anticorpos circulantes possa prevenir a transmissão por transfusão de baixas cargas virais.

#### 4. ARBOVIROSES E POPULAÇÃO TRANSPLANTE ÓRGÃOS SÓLIDOS E HEMATOLÓGICOS

A infecção por arbovírus em pacientes com transplante de células progenitoras hematopoiéticas (TCTH) tem sido pouco descrita na literatura. Os casos mais frequentes decorrem de infecção pelo DENV e ZKV.

O primeiro relato publicado na literatura foi o caso de uma paciente de 16 anos com LMA que apresentou dengue 5 meses após a realização do transplante. A paciente desenvolveu um quadro de rash associado à hepatomegalia e derrame pleural. O caso decorreu de transmissão vetorial e o diagnóstico foi realizado através de RT-PCR<sup>24</sup>.

Duas casuísticas da Ásia também relataram casos de dengue na população TCTH por transmissão vetorial. Um centro brasileiro descreveu 6 casos de pacientes que também desenvolveram dengue. Destes, 3 ocorreram antes e 3 ocorreram após a realização do transplante. Em todos os relatos, a infecção foi autolimitada<sup>25</sup>.

Mais recentemente, estudo brasileiro descreveu 3 casos de infecção por DENV após TCTH<sup>26</sup>. O primeiro caso era um paciente de 4 anos com leucemia linfoblástica aguda que apresentou quadro de febre, mialgia, epistaxe, hemorragia digestiva e pancitopenia 7 meses após o TCTH. O diagnóstico foi realizado pela presença do antígeno NS1 e por meio do RT-PCR para DENV-2.

O segundo caso tratava-se de um homem de 59 anos com LMA que apresentou febre, rash e mialgia 270 dias após a realização do TCTH. Neste caso, o diagnóstico também foi realizado através da detecção do antígeno NS1. E o último caso foi um paciente de 46 anos com leucemia linfocítica aguda (LLA) que apresentou infecção por DENV no 106º dia após o TCTH. Este paciente apresentou febre, cefaléia, fotofobia, náuseas, vômitos e diarreia. O diagnóstico foi confirmado por meio da sorologia para o agente. Os 3 casos apresentaram evolução benigna com duração média dos sintomas de 39 dias.

Nesta mesma publicação, o que chama a atenção é a viremia prolongada apresentada por estes pacientes, variando de 15 até 80 dias.

A maior parte das publicações descreve casos sintomáticos da infecção por DENV com características clínicas semelhantes à população imunocompetente. Entretanto, um trabalho publicado descreve um caso de

encefalite por DENV, que é uma manifestação extremamente rara na população geral. Este relato ocorreu após TCTH em uma paciente de 65 anos com uma doença mieloproliferativa não classificável. Nesta publicação, a paciente apresentava sorologias para DENV, ZKV e CHKV negativas e PCR no líquido cefalorraquidiano (LCR) positivo somente para DENV. Acredita-se que a terapia imunossupressora tenha influenciado na resposta imune da paciente<sup>27</sup>.

Já foi também descrito na Alemanha um caso fatal de dengue após o TCTH<sup>28</sup>. Conforme a publicação, 3 dias após a doação de células progenitoras hematopoéticas para um paciente de 51 anos com leucemia mieloblástica aguda, o vírus foi detectado no doador, que havia relatado ter viajado previamente para o Sri Lanka.

O receptor evoluiu para óbito 9 dias após a realização do transplante. A análise filogenética dos vírus do doador e do receptor demonstrou que o vírus era do sorotipo 1 e que estavam geneticamente relacionados. Entretanto, acredita-se que a causa do óbito foi provavelmente decorrente de doença hepática veno-oclusiva e de enterocolite tóxica relacionados com o regime de condicionamento pós-transplante, e não relacionado diretamente com a arbovirose.

Relatos de infecção por ZKV na população TCTH é menos frequente. Há um caso brasileiro que ocorreu em uma paciente de 9 anos de idade, com anemia de Fanconi, submetida a TCTH na cidade de Curitiba<sup>29</sup>. A mesma era natural do Maranhão e retornou para sua cidade natal após a terapia celular. No 92º dia após o TCTH, a paciente iniciou com parestesia de membros inferiores, incapacidade de deambular e fraqueza muscular. Teve diagnóstico de síndrome de Guillian-Barré (SGB) e foi tratada com imunoglobulina com melhora parcial de sintomas. Recebeu alta hospitalar e retornou posteriormente em decorrência de quadro de insuficiência respiratória, necessitando de suporte ventilatório invasivo.

A amostra do soro da paciente apresentava anticorpos da classe IgM para DENV e ZKV, no 92º e 100º dias após o TCTH. Entretanto, quando foi realizado o teste de neutralização para distinguir as doenças, notou-se que a titulação dos anticorpos da classe IgM anti-ZKV apresentou aumento de mais de 4 títulos nas amostras pareadas, sugerindo que paciente tenha apresentado quadro recente de infecção por ZKV.

Nota-se que a maior parte das publicações emprega a biologia molecular

para o diagnóstico destas entidades infecciosas na população imunossuprimida. O diagnóstico baseado na sorologia ainda é pouco empregado por poder apresentar reação cruzada de anticorpos desenvolvidos em resposta a outras infecções por flavivírus (vírus da febre amarela, vírus da encefalite japonesa, encefalite de St Louis) além de outros vírus não flavivírus como oropouche, mayaro e CHKV.

Além disso, dado o grau de imunocomprometimento do paciente pela doença de base, também pode haver impacto na detecção de anticorpos para determinadas doenças infecciosas.

Nos casos de infecção aguda por DENV, ZKV ou CHKV, tipicamente, os anticorpos da classe IgM começam a se desenvolver cerca de 3-5 dias após o início dos sintomas e podem ser detectados no sangue por até 3 meses<sup>11</sup>. Os anticorpos da classe IgG podem ser detectados a partir do 10º dia da doença clínica e podem persistir por meses a anos.

## 5. RECOMENDAÇÕES DE *SCREENING* EM COMPONENTES SANGUÍNEOS

Apesar dos riscos acima descritos que envolvem a transmissão destes 3 prevalentes agentes por compostos sanguíneos, o *screening* para arbovírus acaba tendo um custo, e isto tem impacto especialmente pois a maioria dos países endêmicos para estes vírus são subdesenvolvidos, o que implica, apenas no questionário verbal como principal metodologia de barreira para descartar compostos sanguíneos virêmicos.

A Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) recomenda triagem laboratorial para infecção por HIV 1 e 2, hepatite B (VHB), hepatite C (VHC), vírus T-linfotrófico humano (HTLV) 1 e 2, sífilis e doença de Chagas<sup>30</sup>.

Portaria brasileira publicada em 2016, mantém a triagem laboratorial recomendada pela OPAS<sup>31</sup>.

Já a agência americana reguladora (FDA)<sup>32</sup> recomenda, além dos agentes listados acima, a testagem laboratorial também para Febre do Nilo.

## **6. RECOMENDAÇÕES DE SCREENING NA POPULAÇÃO TCTH**

Para a população TCTH, conforme recomendação da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea (SBTMO)<sup>33</sup>, a investigação de doenças infecciosas incluem principalmente, na avaliação do doador, as sorologias essenciais incluem o HIV, VHB, VHC e HTLV. Sorologias complementares incluem investigação para Citomegalovírus (CMV), vírus Epstein-Barr (EBV), Sífilis, Toxoplasmose e Chagas.

Conforme consenso da sociedade, somente em casos de surtos epidêmicos ou regiões endêmicas de DENV, é aconselhável realizar a triagem dos doadores para dengue por PCR ou NS1, mesmo em indivíduos assintomáticos.

Para a avaliação do receptor, os exames laboratoriais pré-transplante incluem também sorologia de HIV, VHC, VHB e HTLV I e II, além de investigação sobre o estado sorológico de infecção por CMV, Herpes Simplex (HSV), varicela-zoster (VZV), EBV, Sífilis e Toxoplasmose.

## **7. JUSTIFICATIVA**

Em decorrência do Brasil ser um dos países com maiores prevalências de arboviroses, favorecido pelos aspectos climáticos e populacionais locais, associado ao fato de se destacar no cenário mundial da realização de TCTH, acreditamos que o entendimento do risco de transmissão transfusional pode impactar nas recomendações quanto a este tipo de avaliação nesta população descrita.

## **8. OBJETIVOS**

- Estudar o risco de transmissão de Zika vírus, dengue e chikungunya por hemocomponentes em pacientes receptores de TCTH;

- Descrever as formas de apresentação clínica, as alterações laboratoriais e os métodos diagnósticos de Zika vírus, dengue e chikungunya em pacientes TCTH;

- Descrever a dinâmica viral nos casos confirmados, incluindo padrão de viremia, carga viral e clareamento viral.



## 9. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo coorte prospectivo de pacientes receptores de TCTH realizado no Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), no período de 01 de janeiro de 2017 a 19 de julho de 2018.

### ASPECTOS ÉTICOS

O estudo seguiu os trâmites normais de aprovação regulatória vigentes no país, antes de seu início. Foi submetido à apreciação ao Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da FMUSP e, em seguida, foi submetido à CAPPesq do HC da FMUSP. Em decorrência de mudança física temporária da enfermaria de hematologia do HC para o Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), o projeto também foi submetido ao comitê de ética local.

Todas as informações foram anotadas em protocolos individuais. Os pacientes foram informados do estudo e solicitou-se a aprovação dos mesmos para participação do estudo. Obteve-se para todos os participantes a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

### POPULAÇÃO DO ESTUDO

Para os pacientes serem incluídos no estudo, os mesmos poderiam preencher os critérios através de 2 situações principais:

1. Paciente internado pós-TCTH, sintomático e com clínica sugestiva de arbovirose, independentemente do período em que realizou o seu transplante
2. Paciente internado eletivamente e assintomático para realização de TCTH

**a. Paciente internado pós-TCTH e que apresente sinais ou sintomas sugestivos de arbovirose:** nesta situação, considerou-se como suspeita a presença de quadro febril e pelo menos 1 dos seguintes achados clínicos: rash cutâneo, hepatite (elevação de transaminases), artralgia e/ou manifestação neurológica.

Os sintomas neurológicos considerados foram a presença de encefalite,

meningoencefalite, mielite, paralisias flácidas agudas, ADEM (encefalomielite disseminada aguda) e/ou SGB.

Para estas situações, foi realizada a investigação única da doença através da realização de sorologia para DENV, ZKV e CHKV bem como RT-PCR multiplex para estes agentes.

**b. Paciente internado assintomático para realização de TCTH:** nesta situação, os futuros receptores de TCTH foram avaliados por meio de sorologia para DENV, ZKV e CHKV antes da realização do transplante. Além disso, a amostra de medula, seja de TCTH autólogo ou alogênico, foi também avaliada por meio de RT-PCR para estes arbovírus.

Em algumas situações, conforme dia da internação do paciente e, conseqüentemente momento da sua inclusão no estudo, esta investigação inicial pode ter sido realizada já após a infusão das células tronco-hematopoiéticas.

Independentemente da primeira coleta desta investigação laboratorial ter ocorrido antes ou após a infusão TCTH, foram realizadas sorologias e RT-PCR para DENV, ZKV e CHKV, sequencialmente, 1 vez por semana, até a data da enxertia neutrofílica.

Nestes 2 cenários de inclusão em nosso estudo, dados clínicos, epidemiológicos e demográficos como idade, sexo, profissão, cidade de nascimento, nível socioeconômico e educacional, doença de base, tipo de transplante e terapia imunossupressora foram incluídos na análise de dados.

## **MÉTODOS LABORATORIAIS**

### **SOROLOGIA ELISA E PESQUISA DO ANTÍGENO DA PROTEÍNA NS1 PARA DENGUE**

A pesquisa do antígeno NS1 de DENV foi realizada através de kit do fabricante BIO-RAD®. As sorologias IgM para DENV foram feitas pelo kit MEDIVAX® e as IgG pelo kit da FOCUS®.

As sorologias IgM e IgG para CHKV bem como Imunoglobulina A (IgA) e IgM e IgG para ZKV foram processadas pelo kit do fabricante Euroimmun®.

Todas as metodologias seguiram as recomendações preconizadas por cada fabricante.

## **REAÇÃO EM CADEIA POR POLIMERASE (RT-PCR)**

Um ensaio quantitativo altamente sensível para detecção do ácido nucleico de ZKV, DENV e CHKV foi realizado através de um ensaio de PCR em tempo real, “*in house*”, que amplifica parte do gene do envelope para ZKV e CHKV e região conservada 3UTR para DENV<sup>34,35,36</sup>.

A sensibilidade dessa reação é de aproximadamente 100 cópias/mL. Em todas as reações de amplificação foram utilizados controles positivos e negativos, além de um controle interno.

Como controle interno das extrações de RNA, foram adicionadas 5 µL da vacina da Pólio diluída 1:100 (em água ultrapura), e detectada através de PCR em tempo real específico para verificação da eficiência da extração ou a presença de inibidores utilizando os seguintes iniciadores e sonda especificados na tabela 1.

O RNA foi extraído a partir de 500µL de plasma ou sangue total de cada amostra individualmente utilizando o “kit” MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation – Large Volume (Roche, Alemanha) em aparelho automatizado MagNa Pure Compact Instrument (Roche, Alemanha) e eluição final em 100 µL.

A partir de 5-10µL RNA foi realizado um duplex para detecção de ZKV e CHKV e outro duplex para DENV e PV adicionando-se 10 µL de RNA extraído a 10 µL de TaqMan Master Mix (Applied Biosystems, Foster, CA, EUA) e amplificado por PCR em tempo real utilizando os seguintes iniciadores e sonda segundo tabela 1.

A reação foi realizada utilizando o equipamento StepOne System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e o seguinte programa: 10 minutos a 95°C, seguido por 45-50 ciclos de 15 segundos para 94°C e 60 segundos a 60°C.

### **Mix de amplificação:**

PCR master mix Taqman Fast (20 ou 15ul)

Taqman Fast Virus 1-Step Master Mix 4x	5,0µL
ZKV 60x* / CHIKV 60x*	0,5uL/0,5µL
DENV 60x* / Polio 60x*	0,5uL/0,5µL
RNA	15,0µL

**Mistura de Sonda + primers (60x):**

27µL *primer antisense* 200uM

27µL *primer sense* 200uM

15µL sonda 100uM

31µL TE

**Tabela 1.** Sequência de *primers* empregados

	<b>Sequencia de Primers</b>
<b>ZIKA_F</b>	5' – CCGCTGCCCAACACAAG – 3'
<b>ZIKA_R</b>	5' – CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT – 3'
<b>ZIKA_P</b>	5' FAM – AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA – NFQ-3'
<b>PV_4F</b>	5' – GCTTTATTGCTCCCAGAGTACTCA– 3'
<b>PV_4R</b>	5' – CAATTCGACTGAGGTAGGGTACT– 3'
<b>PV_M</b>	5' VIC – CGTTGGCTTGACTCATTTT - NFQ-3'
<b>CHIKV_F</b>	5'- CGA AAA RGA RCC GGA GRA A- 3'
<b>CHIKV_R</b>	5'- GAT AGT ACC CRG GKC TCA TGA CGT T-3'
<b>CHIKV_P</b>	5' VIC -CCC TRC GCA TGC TTG A – NFQ - 3'
<b>DENV_F</b>	5'- GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCC-3'
<b>DENV_R</b>	5'- GAGACAGCAGGATCTCTGGTC- 3'
<b>DENV_P</b>	5'- AGCATATTGACGCTGGGA-3'

## DEFINIÇÃO DE CASO POSITIVO

Considerou-se como caso positivo aquele que o paciente apresentar resultado de sorologia com soroconversão ou PCR-RT positivo para quaisquer uma das arboviroses delineadas neste estudo.

Nestes casos, foi realizado o levantamento de todos os hemocomponentes que o paciente recebeu durante a internação e, posteriormente foram coletadas sorologias e PCR-RT também destas bolsas de componentes sanguíneos.

Foi considerada como arbovirose transfusional aquela em que o paciente e a bolsa de hemocomponente apresentem resultado positivo para o mesmo agente.

## 10. RESULTADOS

### ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E DEMOGRÁFICOS

Ao todo, foram incluídos 93 pacientes no estudo no período de 01 de janeiro de 2017 a 19 de julho de 2018.

Destes, 91 eram indivíduos assintomáticos e internaram eletivamente para realizar o TCTH no HC da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Além destes, também foram incluídos outros 2 pacientes que internaram sintomáticos pós-TCTH, preenchendo critérios de suspeita de arbovirose aguda, conforme descrito na metodologia do estudo anteriormente.

Estes 2 pacientes sintomáticos apresentaram investigação negativa, seja por meio de sorologia ou RT-PCR para os arbovírus.

Os outros 91 pacientes que internaram eletivamente também tiveram resultado negativo na avaliação de viremia por meio de RT-PCR.

A idade média à época da realização do TCTH foi de 52 anos, variando de 22 a 70; apresentando uma mediana de 57 anos. Houve predominância de indivíduos do sexo masculino (53 pacientes), representando 56,9% dos casos (tabela 2).

A maioria dos pacientes nasceu no estado de São Paulo (SP), representando um total de 40 pacientes. Na região sudeste, também se observou que 7 pacientes eram naturais do estado de Minas Gerais (MG) e 1 do Rio de Janeiro (RJ) – figura 4.

A região nordeste foi o local de nascimento de 32 (34,4%) pacientes: 14 eram naturais da Bahia (BA), 6 de Pernambuco (PE), 5 do Piauí (PI), 3 de Alagoas (AL), 2 do Ceará (CE), 1 do Maranhão (MA) e 1 do Sergipe (SE).

A região sul foi a naturalidade de apenas 7 pacientes, 6 oriundos do estado do Paraná (PR) e 1 de Santa Catarina (SC). Apenas 2 pacientes eram naturais do Pará (PA) e 1 de Mato Grosso do Sul (MS). Havia 3 pacientes naturais de outros países; 1 de Portugal, 1 da Colômbia e 1 da Espanha.

Todos os pacientes eram procedentes da Região Sudeste. Destes, 92 (98,9%) do estado de São Paulo e 1 de Minas Gerais.

**Figura 4.** Mapa brasileiro contendo a distribuição de naturalidade dos 93 pacientes incluídos no estudo



**Tabela 2.** Dados demográficos/epidemiológicos dos 93 pacientes submetidos a TCTH no Hospital das Clínicas da FMUSP janeiro de 2017 a julho de 2018.

Características	Valor (N= 93)
<b>Idade, média (intervalo)</b>	52 (22-70)
<b>Sexo</b>	
Masculino	53 (56,9%)
Feminino	40 (43,1%)
<b>Naturalidade</b>	
Região Sudeste	<b>48 (51,6%)</b>
Região Nordeste	<b>32 (34,4%)</b>
Região Sul	<b>7 (7,5%)</b>
Região Norte	<b>2 (2,1%)</b>
Região Centro-oeste	<b>1 (1%)</b>
<b>Procedência</b>	
Região Sudeste	<b>93 (100%)</b>
Região Nordeste	<b>0</b>
Região Sul	<b>0</b>
Região Norte	<b>0</b>
Região Centro-oeste	<b>0</b>

<b>Desordem Hematológica de Base</b>	
Mieloma Múltiplo	49 (52,6%)
LNH Células B	22 (23,6%)
LNH Células T	7 (7,5%)
LH	
Esclerose Nodular	<b>7 (7,5%)</b>
Depleção Linfocítica	<b>1 (1%)</b>
Zona Cinzenta	<b>1 (1%)</b>
LMA	<b>2 (2,1%)</b>
Células Germinativas de Testículo	<b>1 (1%)</b>
Plasmocitoma Extramedular Solitário	<b>2 (2,1%)</b>
<b>Condicionamento</b>	
MEL	52 (55,9%)
CBV	24 (25,8%)
BEAM	13 (13,9%)
BuFlu	<b>3 (3,2%)</b>
CarboVP	<b>1 (1%)</b>
<b>Comorbidades</b>	
DM	<b>14</b>
HAS	<b>11</b>
Hipotireoidismo	<b>8</b>
Dislipidemia	<b>7</b>
Tabagismo	<b>3</b>
Etilismo	<b>2</b>
Valvulopatia	<b>1</b>
Obesidade	<b>1</b>
Epilepsia	<b>2</b>
Asma	<b>2</b>
Psoríase	<b>1</b>
DPOC	<b>2</b>
DRC	<b>3</b>
ICO	<b>1</b>
HPB	<b>3</b>
<b>Comorbidade Infecçiosa</b>	
HIV	1 (1%)
VHC	0
VHB	3 (3,2%)
HTLV	0
Chagas	2 (2,1%)
Sífilis	0
<b>Arbovirose Prévia</b>	Nº de pacientes
DENV	3 (3,2%)
CHKV	1 (1%)
ZKV	0



<b>Vacina de Febre Amarela Prévia</b>	<b>16 (17.2%)</b>
<b>Sorologias pré-TCTH</b>	
<b>CMV</b> IgM Reagente IgG Reagente	1 (1%) 88 (94,6%)
<b>Toxoplasmose</b> IgM Reagente IgG Reagente	2 (2,1%) 74 (79,5%)
<b>VZV</b> IgM Reagente IgG Reagente	0 92 (98,9%)
<b>HSV</b> IgM Reagente IgG Reagente	2 (2,1%) 90 (96,7%)
<b>EBV</b> IgM Reagente IgG Reagente	0 88 (94,6%)

MEL = melfalano; CBV = ciclofosfamida, carmustina e etoposídeo; BEAM = carmustina, citarabina, etoposídeo e melfalano; BluFlu = Bussulfano com fludarabina; CarboVP = carboplatina, vincristina e prednisona; DM = diabetes mellitus; HAS = hipertensão arterial sistêmica; DPOC = doença pulmonar obstrutiva crônica; DRC = doença renal crônica; ICO = insuficiência coronariana; HPB = hiperplasia prostática benigna; HIV = vírus imunodeficiência humana adquirida; VHC = vírus hepatite C; VHB = vírus hepatite B; HTLV = vírus linfotrópico humano; CMV = citomegalovírus; VZV = varicela - zoster; HSV = herpes simplex; EBV = epstein-barr vírus

## DOENÇA HEMATOLÓGICA DE BASE

Com relação à doença hematológica que motivou a realização do TCTH, houve predominância dos casos de mieloma múltiplo (MM), representando 49 pacientes (52,1%), conforme representado na tabela 2.

Seguindo em frequência os casos de MM, havia linfomas não-Hodgkin (LNH). Destes, 22 casos (23,4%) eram LNH de células B e 7 eram (7,4%) de células T.

Entre os 9 indivíduos (9,5%) com linfoma de Hodgkin (LH), 7 apresentavam a forma clássica da doença (esclerose nodular), 1 a forma de depleção linfocítica e 1 de zona cinzenta.

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) esteve presente em apenas 2 casos (2,1%).

## **ASPECTOS RELACIONADOS AO TCTH**

Do total de 93 TCTH realizados no período supracitado, 91 pacientes (97,8%) realizaram transplante de células progenitoras hematopoiéticas autólogo. Os 2 casos de transplante alogênico foram realizados em um paciente com LMA e um com linfoma de células T do adulto.

Com relação ao condicionamento realizado para o transplante, houve variação de acordo com a doença hematológica de base, conforme descrito na tabela 2.

Em decorrência da maior parte dos casos terem MM como desordem hematológica de base, o principal esquema empregado foi o melfalano (MEL), seguido pelo de ciclofosfamida, carmustina e etoposideo (CBV).

A profilaxia aguda da doença do enxerto contra hospedeiro (GVHD) foi muito pouco empregada na população do estudo, decorrente do fato que a grande maioria dos nossos casos o tipo de transplante empregado foi autólogo.

Em 1 dos casos de transplante alogénio, foi utilizado micofenolato mofetil e ciclosporina (MMF e CsA) como profilaxia de GVHD. E no outro caso, foi a ciclosporina.

## **INFECÇÕES CRÔNICAS ASSOCIADAS**

A ocorrência de infecção VHB, VHC e HIV na população do estudo foi baixa, conforme descrito na tabela 2.

Um paciente foi positivo para HIV (1%); o mesmo apresentava diagnóstico desde 2012, fazendo uso regular de terapia antirretroviral altamente eficaz (HAART). Utilizava lamivudina, efavirenz e tenofovir.

Três pacientes apresentaram diagnóstico de infecção crônica pelo HBV. Os 3 continham o anticorpo contra o antígeno do nucleocapsídeo do HBV (anti-HBc reagente), entretanto, apresentavam carga viral sérica negativa. Nestas 3 situações, utilizou-se o entecavir como profilaxia durante a realização do TCTH.

Na população do estudo, nenhum paciente apresentava sorologia para VHC positiva. Também não foram detectadas a presença de sífilis e a infecção pelo HTLV. Apenas 2 pacientes (2,1%) apresentavam sorologia positiva para Chagas. Um paciente era natural da Bahia e outro de Alagoas. A pesquisa do agente por meio de PCR resultou negativa nas 2 situações.

## **ASPECTOS SOROLÓGICOS**

Os exames sorológicos pré-transplante foram realizados em toda a população do estudo. Foram realizadas sorologias para os seguintes agentes infecciosos: CMV, EBV, Toxoplasmose, HSV e VZV.

Em todos os agentes, foram pesquisadas a presença de anticorpos das classes IgM e também IgG, conforme descrito na tabela 2.

Com relação a sorologia para o CMV, 4 pacientes (4,3%) apresentaram anticorpos da classe IgM com resultado inconclusivo e 1 (1%) com resultado positivo. Nos demais pacientes, o exame foi não reagente. Os anticorpos da classe IgG foram positivos na maioria dos casos (94,6%).

Havia 2 pacientes que apresentavam sorologia de Toxoplasmose IgM reagente (2,1%). Em relação à presença de anticorpos da classe IgG, 74 pacientes (79,5%) apresentaram resultado reagente.

O anticorpo para VZV da classe IgG foi reagente em 92 pacientes (98,9%). Os anticorpos da classe IgM não foram positivos em nenhum caso. Já com relação a sorologia para o HSV, havia 2 casos (2,1%) com resultado reagente para anticorpos da classe IgM e 90 pacientes com IgG reagente.

Anticorpos da classe IgM para EBV não foram detectados em nenhuma amostra. Os anticorpos da classe IgG foram reagentes em 88 pacientes.

## **PRESENÇA DE COMORBIDADES**

A presença de comorbidades esteve presente em 55 pacientes (59,1%). A de maior prevalência foi a diabetes mellitus (DM), seguida por hipertensão arterial sistêmica (HAS) e hipotireoidismo, conforme descrito na tabela 2.

## **ARBOVIROSE PRÉVIA**

Apesar do nosso país ser endêmico para as arboviroses, conforme descrito previamente, apenas 4 pacientes (4,3%) relataram a sua ocorrência no passado (tabela 2), sendo 1 caso de infecção por CHIKV e 3 casos de DENV.

Um paciente do sexo masculino refere diagnóstico de infecção por CHIKV em janeiro de 2016. O mesmo relata que a infecção ocorreu quando estava com sua família em uma viagem no estado de PE.

Os outros casos de DENV também ocorreram em pacientes do sexo masculino, e todos os diagnósticos ocorreram no estado de São Paulo. Todos os 3 casos tiveram diagnóstico clínico, sem confirmação laboratorial.

Nenhum paciente relatou antecedente pessoal e/ou familiar de infecção por ZIKV.

## **VACINA DE FEBRE AMARELA**

A realização da vacina para febre amarela antes do TCTH ocorreu em 16 pacientes (17,2%). Em 4, a imunização ocorreu em um período superior a 10 anos da realização do TCTH; 8 receberam a vacina em período inferior a este e 4 pacientes não tinham comprovante da data de sua realização.

Destes pacientes, apenas 1 apresentou sorologia positiva para ZIKV.

## **PESQUISA DE ARBOVIROSE NA POPULAÇÃO TCTH**

### **SOROLOGIA PARA DENGUE ANTICORPOS DA CLASSE IgM**

A sorologia dos anticorpos da classe IgM para DENV foi realizada em 311 amostras, 218 provenientes de sangue periférico e 91 de medulas.

Destas, 23 amostras (7,3%) apresentaram resultado reagente. As amostras positivas pertenciam a 9 pacientes. A distribuição conforme semana da realização do transplante está esquematizada na tabela 3.

A grande maioria das amostras positivas ocorreu em pacientes do sexo masculino (66,6%). Nota-se que a maioria dos pacientes são naturais do Estado de São Paulo e da Bahia, representando 44,4%, respectivamente. Quando avaliadas por regiões do nosso país, a maioria dos pacientes eram naturais da região Nordeste (55,5%).

Destes casos com sorologia IgM reagente, nenhum paciente relatou histórico anterior de ocorrência de arbovirose. Apenas 1 paciente recebeu vacina de febre amarela prévia, conforme descrito na tabela 3, o que poderia justificar

uma possível reação cruzada com a sorologia de DENV.

A maior parte das sorologias reagentes ocorreu nos meses de janeiro a maio, compatível com período de maior incidência de DENV em nosso país.

O que chama a atenção é o paciente de 32 anos, sexo feminino, cuja amostra inicial (pré-transplante) apresentou resultado não reagente para a sorologia de IgM DENV. Entretanto, nas amostras subsequentes, o resultado ficou reagente. Trata-se de uma das pacientes que realizou transplante de medula alogênico haploidêntico aparentado e, em nosso trabalho, conforme descrito na metodologia, foi considerada como caso positivo.

## ANTÍGENO NS1

A pesquisa do antígeno capsular NS1 de DENV foi realizada em 311 amostras, 220 provenientes de sangue periférico e 91 de medulas. Não foi encontrada nenhuma amostra reagente, conforme descrito na tabela 3.

**Tabela 3.** Distribuição dos resultados da classe de anticorpos IgM reagentes contra DENV conforme semana do TCTH do HC/FMUSP

Idade	Naturalidade	Mês TCTH	Vacina Febre Amarela	Semana do TCTH	Resultado Sorologia	NS1
57 anos	Bahia	Janeiro 2017	Não	D -4 D +3 D +10	Reagente Reagente Reagente	NR NR NR
60 anos	Bahia	Janeiro 2017	Não	D -6 D 0 D +7	Reagente Reagente Reagente	NR NR NR
70 anos	Bahia	Janeiro 2017	Não	D -4 D +2 D +9	Reagente Reagente NR <sup>1</sup>	NR NR NR
38 anos	São Paulo	Fevereiro 2017	Não	D +2 D +9	Reagente Reagente	NR NR
41 anos	Piauí	Junho 2017	2013	D +3 D +10	Reagente Reagente	NR NR
27 anos	Bahia	Junho 2017	Não	D -1 D +6	Reagente Reagente	NR NR
62 anos	São Paulo	Agosto 2017	Não	D -8 D -1 D +6	Reagente Reagente Reagente	NR NR NR
36 anos	São Paulo	Outubro 2017	Não	D -10 D -3 D +4 D +11	Reagente Reagente Reagente Reagente	NR NR NR NR
32 anos	São Paulo	Fevereiro 2017	Não	D -6 D +1 D +7	NR Reagente Reagente	NR NR NR

NR = não reagente

## SOROLOGIA PARA DENGUE ANTICORPOS DA CLASSE IgG

A sorologia da classe de anticorpos IgG para DENV também foi realizada em 311 amostras, 220 provenientes de sangue periférico e 91 de medulas.

Destas, 32 amostras (10,2%) apresentaram resultado reagente. As amostras positivas pertenciam a 15 pacientes.

A distribuição conforme semana da realização do transplante está esquematizada na tabela 4.

**Tabela 4.** Distribuição dos resultados da classe de anticorpos IgG reagentes contra DENV conforme semana do TCTH do HC/FMUSP

Idade	Naturalidade	Mês TCTH	Vacina Febre Amarela	Semana do TCTH	Anticorpo da classe IgG
57 anos	Bahia	Janeiro 2017	Não	D -4 D +3 D +10	Reagente Reagente Reagente
60 anos	Bahia	Janeiro 2017	Não	D -6 D 0 D +7	Reagente Reagente Reagente
31 anos	São Paulo	Fevereiro 2017	Não	D -6 D 0 D +7	Reagente Reagente Reagente
41 anos	Piauí	Junho 2017	2013	D +3 D +10	Reagente Reagente
27 anos	Bahia	Junho 2017	Não	D -1 D +6	Reagente Reagente
23 anos	Rio de Janeiro	Julho 2017	Não	D -6 D +1 D +8	Reagente Reagente Reagente
62 anos	São Paulo	Julho 2017	Não	D -8 D -1 D +6	Reagente Reagente Reagente
59 anos	São Paulo	Julho 2017	Não	D -7 D 0 D +7	Reagente Reagente Reagente
49 anos	São Paulo	Agosto 2017	Não	D +1 D +8	NR <sup>1</sup> Reagente
65 anos	Portugal	Agosto 2017	Desconhece	D +2 D +9	Reagente Reagente
60 anos	Maranhão	Setembro 2017	Não	D 0 D +7	NR Reagente
54 anos	Piauí	Outubro 2017	1981	D -5 D +2	Reagente Reagente
24 anos	São Paulo	Novembro 2017	2007	D 0 D +7	Reagente Reagente

59 anos	São Paulo	Agosto 2017	Não	D -7 D 0 D +7	<b>NR</b> <b>NR</b> <b>Reagente</b>
22 anos	São Paulo	Setembro 2017	Não	D -8 D -1 D +6	<b>NR</b> <b>NR</b> <b>Reagente</b>

NR = não reagente

Destas amostras reagentes para anticorpos da classe IgG de DENV, a maioria predominou em indivíduos do sexo masculino (60%).

Destes 15 pacientes, 10 (66,6%) apresentaram apenas o resultado de sorologia IgG reagente. Os outros 5 pacientes apresentaram concomitantemente sorologia IgM e IgG reagentes para DENV.

Nota-se que a maioria dos pacientes são procedentes do Estado de São Paulo (46,6%). Quando avaliadas por regiões do nosso país, a maioria dos pacientes são naturais da região Sudeste (53,3%).

Destes casos com sorologia reagente, apenas 1 paciente (6,6%) relatou diagnóstico anterior de dengue e somente 4 pacientes (33,3%) receberam vacina de febre amarela prévia, o que evidencia baixa probabilidade de ter ocorrido reação cruzada.

A maior parte das sorologias reagentes ocorreram no 2º semestre do ano, diferentemente dos casos de sorologia IgM reagentes.

O que chama a atenção é que 4 pacientes (26,6%) apresentaram soroconversão ao longo das semanas do TCTH. Estes, preencheram critérios de caso positivo do nosso estudo, conforme descrito na metodologia anteriormente.

### **SOROLOGIA PARA CHIKUNGUNYA ANTICORPOS DA CLASSE IgM**

A realização da sorologia de anticorpos da classe IgM para Chikungunya foi feita em 311 amostras, 220 provenientes de sangue periférico e 91 de medulas. Não foi encontrada nenhuma amostra com resultado reagente.

### **SOROLOGIA PARA CHIKUNGUNYA ANTICORPOS DA CLASSE IgG**

A sorologia para CHKV anticorpos da classe IgG também foi realizada em 311 amostras, 220 provenientes de sangue periférico e 91 de medulas. Destas, 6 amostras (1,9%) apresentaram resultado reagente. As amostras positivas pertenciam a 2 pacientes, ambos do sexo masculino, naturais do estado do Rio

de Janeiro e Paraná.

Todas as primeiras amostras foram coletadas antes da infusão das células progenitoras hepatopáticas.

A distribuição conforme a semana da realização do transplante está esquematizada na tabela 5.

**Tabela 5.** Distribuição dos resultados da classe de anticorpos IgG reagentes contra CHKV conforme semana do TCTH do HC/FMUSP

<b>Idade</b>	<b>Naturalidade</b>	<b>Mês TCTH</b>	<b>Vacina Febre Amarela</b>	<b>Semana do TCTH</b>	<b>Anticorpo da classe IgG</b>
23 anos	Rio de Janeiro	Julho 2017	Não	D -6 D +1 D +8	Reagente Reagente Reagente
67 anos	Paraná	Agosto 2017	Não	D -5 D +2 D +9	Reagente Reagente Reagente

Destes 2 casos, o primeiro paciente relatou histórico de infecção por CHKV 1 ano antes da realização do TCTH. O outro paciente não apresentava relato pregresso de arbovirose.

Este mesmo paciente também apresentou sorologia IgG reagente para DENV concomitantemente. As amostras do primeiro paciente foram coletadas no mês de julho e as do segundo paciente em agosto. Não foram observadas soroconversões nestes 2 casos.

### **SOROLOGIA PARA ZIKA VÍRUS ANTICORPOS DA CLASSE IgA/ IgM**

Os anticorpos das classes IgA/M para ZKV foram realizados em 311 amostras, 220 provenientes de sangue periférico e 91 de medulas. Não foi encontrada nenhuma amostra com o resultado reagente.

### **SOROLOGIA PARA ZIKA VÍRUS ANTICORPOS DA CLASSE IgG**

A sorologia de anticorpos da classe IgG para ZKV, também foi realizada em 311 amostras, 220 provenientes de sangue periférico e 91 de medulas. Destas, 9 amostras (2,8%) apresentaram resultado reagente para classe IgG de anticorpos.

A distribuição da positividade da sorologia conforme a semana da



realização do TCTH está esquematizada na tabela 6.

**Tabela 6.** Distribuição dos resultados da classe de anticorpos IgG reagentes conforme semana do TCTH do HC/FMUSP

<b>Idade</b>	<b>Naturalidade</b>	<b>Mês TCTH</b>	<b>Vacina Febre Amarela</b>	<b>Semana do TCTH</b>	<b>Anticorpos da classe IgG</b>
27 anos	Bahia	Junho 2017	Não	D -1 D +6	<b>Reagente</b> <b>Reagente</b>
62 anos	São Paulo	Agosto 2017	Não	D -8 D -1 D +6	<b>Inconclusivo</b> <b>Inconclusivo</b> <b>Inconclusivo</b>
22 anos	São Paulo	Setembro 2017	Não	D -1 D +6	<b>Reagente</b> <b>Reagente</b>
52 anos	Alagoas	Janeiro 2018	2008	D +9	<b>Reagente</b>
25 anos	São Paulo	Fevereiro 2018	Não	D +6	<b>Reagente</b>
51 anos	Bahia	Março 2018	Não	D -7 D +1 D +7	<b>Reagente</b> <b>Reagente</b> <b>Reagente</b>

Destas amostras reagentes para anticorpos da classe IgG de ZKV, a maioria predominou em indivíduos do sexo feminino (83,3%).

Destes 6 pacientes, 4 (66,6%) apresentaram apenas o resultado de anticorpos da classe IgG reagente. Os outros 2 pacientes apresentaram concomitantemente anticorpos das classes IgM e IgG reagentes para DENV.

Conforme nota-se pela tabela 6, um paciente apresentou resultado de IgG inconclusivo. As suas amostras foram repetidas por 2 vezes, mantendo o achado.

A maioria dos pacientes (6) eram naturais do Estado de São Paulo (50%). Destes casos com sorologia reagente, apenas 1 paciente (16,6%) relatou diagnóstico anterior de arbovirose. A mesma menciona diagnóstico clínico de ZKV em 2015 enquanto estava em viagem em Fortaleza, capital do Ceará. Apresentou na ocasião mialgia, artralgia e rash maculopapular difuso.

Somente 1 paciente (16,6%) recebeu vacina de febre amarela previamente, conforme descrito na tabela 6.

A maior parte das sorologias reagentes ocorreram durante o 1º semestre do ano.

## PCR DENV/ZKV/CHKV

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) para DENV, ZKV e CHKV foi realizada em 311 amostras. Não foi encontrado nenhum resultado positivo, conforme descrito na tabela 7.

**Tabela 7.** Distribuição dos PCR de DENV/CHKV e ZKV dos 93 pacientes de TCTH do HC/FMUSP

Fonte	RT-PCR DENV/ZKV e CHKV
Medula Óssea N=91	ND <sup>1</sup>
Sangue Periférico N=220	ND

<sup>1</sup>Não detectável

## CASOS DE SOROCONVERSÃO DENV

Tivemos 5 casos (5,3%) considerados positivos em nossa amostra populacional, conforme descrito na tabela 8. Todos eles decorreram de soroconversão sorológica. Não identificamos nenhum caso positivo por meio de RT-PCR.

Exceto pelo primeiro paciente, os demais realizaram o TCTH nos meses de agosto e setembro de 2017.

Um caso ocorreu por meio da soroconversão da sorologia IgM para DENV. Trata-se de uma paciente de 31 anos, natural de São Paulo, sexo feminino, com LMA que realizou em 15/02/17 TCTH alogênico haploidêntico, cujo irmão foi doador. Dois dias após a coleta da amostra sérica que identificou a soroconversão, paciente evoluiu com episódio febril e sinais e sintomas de infecção de via aérea superior. Realizou investigação de vírus respiratório sem resgate de agente. Apresentou uma boa resposta após início de antibioticoterapia de amplo espectro, conforme protocolo institucional, e teve a enxertia neutrofílica 13 dias após o TCTH.

Os outros 4 casos decorreram de soroconversão para sorologia anticorpos da classe IgG de DENV. Todos os casos foram de pacientes que realizaram TCTH autólogo.

Um caso trata-se de uma paciente do sexo feminino, 49 anos, natural de São Paulo e que tinha MM de cadeia Kappa leve. Paciente realizou TCTH no dia

02/08/17. Apresentou quadro febril antes da coleta da amostra que identificou a soroconversão. Não foi isolado nenhum agente infeccioso. Teve enxertia neutrofílica no D +11 do TCTH.

Outro caso positivo ocorreu em um paciente de 60 anos, natural do Maranhão, sexo masculino e portador de MM IgG Kappa. Paciente realizou o TCTH no dia 21/09/17. Evoluiu sem intercorrências e apresentou a enxertia neutrofílica no D +11.

Em outro caso, trata-se de uma paciente de 59 anos, natural de São Paulo, portadora de MM IgA Kappa. Paciente realizou o TCTH em 03/08/17, evoluiu também sem intercorrências e teve a enxertia neutrofílica 10 dias após.

E o último paciente realizou TCTH no dia 01/09/17. Era um paciente com 22 anos, sexo masculino e natural de São Paulo. Era portador de linfoma não-Hodgkin de grandes células B. Apresentou quadro febril 2 dias antes da detecção de soroconversão. Não foi isolado nenhum agente infeccioso. Paciente evoluiu bem e foi de alta posteriormente. A enxertia neutrofílica ocorreu 13 dias após transplante.

Todos os casos que apresentaram soroconversão receberam alta hospitalar com seguimento ambulatorial.

**Tabela 8.** Distribuição de casos soroconversão arbovírus ou DENV positivos dos pacientes de TCTH do HC/FMUSP

Tipo TCTH	MES TCTH	Natural	TCTH	Linf <sup>1</sup>	AST <sup>2</sup>	ALT <sup>3</sup>	Sintoma Neurológico	Rash	Febre	EN <sup>4</sup>
Alogênico	Fevereiro 2017	São Paulo	D -6 D +1 D +7	1480 80 0	16 65 17	25 117 77	Não	Não	Sim	D +13
autólogo	Agosto 2017	São Paulo	D +1 D +8	200 0	24 10	19 11	Não	Não	Sim	D +11
autólogo	Setembro 2017	Maranhão	D 0 D +7	400 0	32 32	23 25	Não	Não	Não	D +11
autólogo	Agosto 2017	São Paulo	D -7 D 0 D +7	400 0 0	12 30 12	12 18 12	Não	Não	Não	D +13
autólogo	Setembro 2017	São Paulo	D -8 D -1 D +6	1000 0 0	41 39 57	56 41 83	Não	Não	Sim	D +13

<sup>1</sup>Contagem de linfócitos; <sup>2</sup>Aspartato aminotransferase; <sup>3</sup>Alanina aminotransferase; <sup>4</sup>Enxertia neutrofílica

# INVESTIGAÇÃO DE TRANSMISSÃO TRANSFUSIONAL DAS ARBOVIROSES

## CASOS COM PRIMEIRA AMOSTRA IgM REAGENTE

Nos casos que o paciente apresentou a primeira amostra coletada, seja pré ou pós infusão das células tronco-hematopoiéticas com resultado IgM reagente para DENV, foi aventada como hipótese o paciente ter sido exposto à componente sanguíneo virêmico recente.

Uma outra possibilidade, dado cenário brasileiro endêmico, seria da transmissão da doença vetorial. Como nenhum destes pacientes relatou diagnóstico recente de algum arbovírus, tornando a segunda hipótese mais remota, foi realizada a investigação dos componentes sanguíneos recebidos nos últimos 3 meses, por meio de RT-PCR para DENV, ZKV e CHKV.

Este processo foi realizado com o apoio do banco de sangue do HC/FMUSP (Fundação Pró-sangue). É importante destacar que em algumas situações, o paciente pode ter recebido um componente sanguíneo que era proveniente de mais de um doador, por exemplo, *pool* de plaquetas.

Em todos os casos estudados, todas as amostras destes doadores foram avaliadas por biologia molecular.

Não foi encontrado nenhum caso de hemocomponentes virêmicos no estudo que pudessem justificar transmissão transfusional nestes pacientes com primeira amostra com resultado IgM reagente, conforme descrito na tabela 9.

**Tabela 9.** Investigação de transmissão transfusional de arbovirose dos casos com DENV IgM reagente

Hemocomponentes	RT-PCR DENV/ZKV e CHKV
Sem registro	-
5 componentes sanguíneos	ND <sup>1</sup>
Sem registro	-
3 componentes sanguíneos	ND
6 componentes sanguíneos	ND
13 componentes sanguíneos	ND

19 componentes sanguíneos	ND
21 componentes sanguíneos	ND

<sup>1</sup>Não detectável

Realizou-se também investigação por meio de sorologia nos componentes sanguíneos destes casos.

De uma forma em geral, nos 6 casos de pacientes com sorologia pré-TCTH com DENG IgM reagente, foram encontrados em 4 casos também positividade de IgM para este mesmo agente.

Há desta forma, portanto, a possibilidade de que a sorologia inicial seja IgM reagente de DENV em decorrência de transmissão de anticorpos por transfusão, uma vez que não foi encontrada nenhuma bolsa virêmica e nenhum paciente relatou doença clínica por arbovírus com diagnóstico recente.

## **CASOS SOROCONVERSÃO PARA DENV**

Em todos os 5 casos de soroconversão DENV, conforme previamente descrito, foram levantados todos os hemocomponentes que cada paciente recebeu entre a última sorologia negativa até a data da sorologia que apresentou resultado com soroconversão.

Em todos os casos, todas as amostras dos doadores foram avaliadas por meio de RT-PCR para os 3 agentes infecciosos do estudo. Os dados da investigação estão representados na tabela 10. Não foi encontrado nenhum caso de hemocomponente virêmico nesta investigação.

**Tabela 10.** Investigação de transmissão de arbovirose transfusional dos casos positivos arbovírus dos pacientes de TCTH do HC/FMUSP.

Hemocomponentes	RT-PCR DENV/ZKV e CHKV
10 componentes sanguíneos	ND <sup>1</sup>
10 componentes sanguíneos	ND
5 componentes sanguíneos	ND
10 componentes sanguíneos	ND
43 componentes sanguíneos	ND

<sup>1</sup>Não detectável

A realização de sorologia nos componentes sanguíneos destes casos trouxe alguns resultados interessantes.

O paciente que apresentou soroconversão para DENV IgM, teve 1 hemocomponente recebido que evidenciou sorologia IgM tanto para DENV quanto para CHKV reagentes. Todos os demais compostos sanguíneos apresentaram resultado negativo para NS1, CHKV IgM, ZKV IgM e IgG.

Os demais pacientes apresentaram soroconversão para DENV IgG. Entretanto, apesar deste achado, por limitação em decorrência de disponibilidade de kits de sorologia, não foi realizada a investigação nestas bolsas de sorologia IgG DENV.

Na investigação dos compostos sanguíneos destes 4 pacientes com conversão para IgG DENV, havia no *pool* compostos com resultado reagente para DENV IgM.

## 11. DISCUSSÃO

O Brasil é um país de clima tropical altamente povoado, apresentando um terço do seu território coberto por florestas. Associado a isso, há a infestação por mosquitos dos gêneros *Culex* e *Aedes*, deixando o nosso país sob um risco constante de emergência e reemergência de arboviroses<sup>37</sup>.

Estas doenças além de apresentarem um *overlap* na distribuição geográfica, sinais e sintomas, também possuem sazonalidade e taxas de ataque similares<sup>38,39</sup>.

Desde 2015, temos enfrentado um importante desafio de saúde pública no que se refere à presença de 4 arbovírus co-circulantes: DENV, ZKV, CHKV e o vírus da Febre Amarela.

No presente estudo, encontramos baixa prevalência dos casos considerados positivos, representando apenas 5,37% dos casos. Este achado pode ser decorrente de algumas variáveis. Primeiramente, apesar dos números elevados de casos de arboviroses em nosso país, nota-se uma tendência nacional na redução dos casos, durante a realização do estudo.

Para se ter uma idéia, em nosso país, nos anos de 2015 e 2016 foram registrados 1.688.688 e 1.500.535 casos de dengue confirmados. No período em que o nosso estudo foi desdobrado, o número de casos registrados foi bem inferior, apresentando 239.389 e 262.594 casos nos anos de 2017 e 2018, respectivamente<sup>40</sup>.

Notou-se também, em relação ao ano de 2017, uma queda pronunciada de diagnósticos de ZKV, havendo uma redução de 92% dos casos de infecção por este agente<sup>41,42,43</sup>.

Além do cenário epidemiológico externo evidenciando menor circulação dos arbovírus, casuísticas nacionais também encontraram baixa prevalência destes agentes em doadores de sangue assintomáticos, mesmo nos períodos em que havia maior circulação destes vírus.

Estudo realizado em 2015, na cidade de Campinas, encontrou prevalência de 0,15%, 0,05% e 0% para DENV, ZKV e CHKV, respectivamente, em doadores de sangue assintomáticos.

No ano de 2016, os dados foram de 0,62%, 0,17% e 0% de DENV, ZKV e CHKV, respectivamente<sup>44</sup>. Outra publicação realizada também no mesmo ano, durante 4 semanas consecutivas entre fevereiro e março, encontrou uma

prevalência de ZKV em doadores assintomáticos de apenas 0,16%<sup>45</sup>.

Artigo também envolvendo doadores assintomáticos, realizado em Ribeirão Preto, entre outubro de 2015 e maio de 2016, encontrou uma prevalência de 2,7% de ZKV. Neste estudo, o pico de casos deste agente foi em abril de 2016<sup>46</sup>.

Além disso, um outro possível fator que também pode justificar a baixa prevalência encontrada no nosso estudo seria a limitação geográfica da nossa população. Apesar dos nossos pacientes serem naturais de diversos estados brasileiros, a maioria deles eram procedentes do Estado de São Paulo, em particular da capital São Paulo.

Apesar da menor circulação destes vírus a nível nacional, conforme descrito previamente, sabemos que a sua distribuição não ocorre de forma uniforme em nosso país; havendo maior prevalência de casos de ZKV e CHKV, por exemplo, nos estados do nordeste, e de DENV na região centro-oeste.

Além disso, o banco de sangue que é responsável pela matéria-prima dos hemocomponentes dos pacientes HC/FMUSP é composto, principalmente, por doadores voluntários do estado de São Paulo.

Desta forma, tanto os doadores de sangue quanto a população estudada, não estavam temporalmente e espacialmente pertencentes a locais com elevada ocorrência de arbovírus no período de inclusão no estudo<sup>41,47,48</sup>.

Uma outra questão que se têm aventado ultimamente, seria a relação entre a presença de anticorpos para DENV e a ocorrência da infecção por ZKV, uma vez que os dois agentes estão geneticamente e antigenicamente relacionados. Estudo realizado na cidade de Salvador, epicentro da epidemia de ZKV no nosso país e cidade hiperendêmica para DENV, avaliou esta possibilidade<sup>49</sup>.

Nesta publicação, amostras de sangue coletadas entre outubro de 2014 e março de 2015, anterior à epidemia de ZKV em Salvador, apresentaram apenas 7% e 8% de soropositividade para este agente, respectivamente. Em contrapartida, 63% das amostras coletadas em outubro de 2015, 5 meses após o reconhecimento dos casos clínicos de ZKV, foram positivas. Entre os indivíduos que tinham imunidade prévia ao DENV foi associada uma redução de 9% (IC 95%, 1 a 17%) do risco de infecção por ZKV.

Como tivemos em nossa população a maior parte dos pacientes já apresentando sorologia IgG positiva para DENV, o não encontro de casos de



ZKV pode ser, pelo menos parcialmente, justificado por tal achado.

Além disso, o padrão da transmissão de ZKV em nosso país é consistente com o surgimento de um patógeno altamente transmissível e principalmente assintomático, seguido pela redução da transmissão, uma vez que uma grande proporção de indivíduos se torna imune ao agente. Estes achados também fornecem suporte empírico para a hipótese de que a imunidade acumulada levou o ZIKV à extinção local, reduzindo a eficiência da sua transmissão.

Como observado nos nossos resultados, todos os casos positivos foram decorrentes da presença de soroconversão. A não detecção de casos por meio de RT-PCR pode ser decorrente de algumas variáveis.

Primeiramente, uma limitação seria por se tratar de um RT-PCR *in house* e não kit comercialmente disponível. Entretanto, além da não existência de kits comerciais em nosso país no período da realização do nosso estudo, uma publicação de 2018 conduzida em 15 laboratórios brasileiros, incluindo o laboratório que realizou a PCR do nosso estudo, validou a qualidade do teste de biologia molecular empregado em nossa instituição<sup>50</sup>.

Nesta publicação, os laboratórios receberam 12 amostras sanguíneas, das quais 4 continham ZKV com carga viral entre  $10^3$  a  $10^6$  cópias/ml. Nosso laboratório apresentou compatibilidade no resultado das 12 amostras analisadas, apresentando, desta forma, uma validação externa.

Como ponto favorável, o nosso RT-PCR apresenta um limite de detecção de apenas 100 cópias/ml, fazendo com que dificilmente, mesmo em casos de viremias muito baixas, não fossem detectados por esta metodologia.

Apesar de pouco estudado, acredita-se que os pacientes infectados com DENV e que são assintomáticos, provavelmente apresentariam uma viremia menor do que os pacientes que desenvolvem manifestações clínicas, porém, mesmo assim, seriam detectados pelo nosso método laboratorial<sup>9</sup>.

Trabalho publicado em 2017 com 29 indivíduos (sintomáticos ou assintomáticos) que viajaram para locais de transmissão de ZKV, com RT-PCR positivo confirmado para este arbovírus, encontrou uma carga viral média de 300-500 cópias/ml no plasma, o que seria detectado caso nosso método de biologia molecular fosse empregado para o diagnóstico<sup>51</sup>.

Além disso, apesar de utilizarmos a vacina da pólio para nosso controle interno da extração de RNA, associado ao fato da existência da vacinação maciça da população brasileira para poliomielite, isso poderia influenciar em

promover a ocorrência de resultados falso-positivos em nossa amostra, o que não ocorreu.

Na investigação dos hemocomponentes, também como ponto favorável, foram testados os *pools* e também cada amostra separadamente. Ao todo, foram analisadas 145 amostras individualmente dos componentes sanguíneos, incluindo todos os casos considerados como positivos, bem como os pacientes com primeira sorologia IgM reagente. Desta forma, dificilmente haveria resultados falso-positivos. Uma explicação do que poderia ocorrer seria a existência de duas ou mais amostras com cargas virais baixas e que, no mesmo *pool*, as duas juntas atingiram o limiar de detecção do método, promovendo um resultado positivo.

Outra preocupação que poderia ser levantada, como possível fator que pudesse impactar em nosso resultado, além do limite de detecção da carga viral, seria a relacionada com a duração da viremia.

Entretanto, na população assintomática do nosso estudo, como o intervalo entre as coletas das amostras foi de 7 dias, dificilmente pode-se justificar a não detecção dos agentes através do RT-PCR em decorrência do período de viremia.

Várias publicações têm mostrado que a viremia, especialmente do DENV, é mais prolongada em pacientes imunocomprometidos do que na população geral<sup>26,52</sup>.

Outro fator que poderia ter impacto nos nossos resultados está relacionado à espécime clínica em que foi realizada a análise. Na nossa população, utilizamos apenas o sangue total para investigação por biologia molecular. Previamente, acreditava-se que a virúria do agente era mais sensível e prolongada do que a sua detecção no sangue.

Atualmente sabemos que a presença de RT-PCR de ZKV na urina e no trato genital dos pacientes apresenta importância mais relacionada à transmissão sexual da doença. Sugere-se que a excreção renal do agente se inicie cerca de 4 dias após o início dos sintomas<sup>53</sup>. Entretanto, está bem estabelecido que a positividade das amostras para ZKV é maior quando realizada no sangue total do que quando proveniente de outras fontes biológicas, por exemplo urina.

Estudo prospectivo realizado com pacientes do sexo masculino e com diagnóstico de infecção por ZKV evidenciou maior índice de positividade das amostras provenientes do sangue total (67%) do que amostras de soro e urina.

Além disso, como os indivíduos realizaram *follow-up* de 120 dias após o início dos sintomas nesta publicação, notou-se que 23% dos pacientes apresentavam RNA positivo no sangue total no 120º dia, enquanto que apenas 2 amostras de urina foram positivas com 30 dias<sup>54</sup>.

Outra publicação norte-americana também encontrou maior sensibilidade e duração de positividade do PCR de ZKV quando realizado no sangue total comparado ao soro ou urina. Até o 79º dia após o início dos sintomas, a sensibilidade do PCR de ZKV foi superior a 80%<sup>55</sup>.

Em decorrência da evidência supracitada, optamos, conseqüentemente, em nosso estudo, em não incluir a análise do RT-PCR nas amostras de urina dos nossos pacientes, apesar desta poder ser considerada uma limitação do estudo. O trabalho foi inicialmente desenhado para avaliar apenas sangue, e portanto, não tínhamos as amostras de urina dos primeiros 50 pacientes incluídos no primeiro relatório FAPESP.

Acreditamos que se tivéssemos algum caso positivo, seria interessante a realização da biologia molecular também neste fluido corporal, porém, nenhuma amostra analisada teve resultado detectável.

A duração da viremia no sangue total também apresentou duração maior do que a realizada no plasma, em outra publicação<sup>56</sup>. Em todas as nossas amostras, o RT-PCR para arbovírus foi realizado no sangue total.

Já com relação ao diagnóstico laboratorial baseado na sorologia, sabemos que seu valor é limitado pela possibilidade de existir reação cruzada de anticorpos desenvolvidos em resposta a outras infecções, especialmente em localidades onde há grande ocorrência de outros flavivírus como em nosso país<sup>57,58,59,60</sup>.

Além disso, existe a preocupação com relação a sensibilidade da metodologia. O *Center for Disease Control* (CDC) dos Estados Unidos da América recomenda para os pacientes com suspeita de infecção por ZKV, a coleta de anti-ZKV IgM que deve ser realizada 2 a 12 semanas após o início dos sintomas ou dentro de 14 dias do aparecimento do quadro clínico se o RT-PCR for negativo<sup>61</sup>.

Em nosso trabalho, o kit empregado de sorologia tanto de ZKV quanto de CHKV foi da Euroimmun. A sensibilidade e a especificidade destas reações sorológicas para diagnóstico da infecção aguda é variável.

Estudo conduzido em 2018 que avaliou pacientes do sexo masculino e

sintomáticos, com diagnóstico confirmado de infecção por ZKV (por meio de PCR na urina ou soro) demonstrou que anticorpos da classe IgM da Euroimmun foram positivos em 60% destes indivíduos<sup>62</sup>. A comparação dos resultados deste kit com o MAC-ELISA, em pacientes sintomáticos (principalmente com pacientes do sexo feminino) com média da coleta da amostra no 4º dia do início dos sintomas, mostrou um resultado de sensibilidade de apenas 28,9% e especificidade de 96,6% de IgM para ZKV. Para o IgG, a sensibilidade e a especificidade foram de 23,7% e 95,2%, respectivamente<sup>63</sup>.

Outro estudo empregando o mesmo kit em amostras confirmadas por RT-PCR para ZKV encontrou uma sensibilidade do IgM de 58%<sup>64</sup>. Este estudo e outro destacam que tal kit é altamente específico para infecção por ZKV, sendo incomum a ocorrência de reação cruzada com DENV, outros flavivírus e com a vacinação prévia para febre amarela<sup>65</sup>.

A exemplo disso, em nosso estudo encontramos apenas 2 casos de pacientes que apresentaram resultado concomitante de sorologia para DENV e ZKV reagentes e 1 com sorologia para DENV e CHKV reagentes. Neste último caso, o paciente relatava ocorrência de CHKV progressivamente e como DENV é da família *Flaviviridae* e CHKV da *Togaviridae*, a probabilidade de se tratar de uma reação cruzada é mais remota.

Outro trabalho que estudou a soroprevalência de infecção por ZKV em doadores de sangue, empregando mesmo Kit que em nossa casuística, encontrou uma especificidade para a detecção de IgG de 67,2%<sup>60</sup>.

Uma outra preocupação com o emprego de sorologia para o diagnóstico estaria relacionada com o tempo de seu aparecimento após uma infecção aguda. Entretanto, é importante ressaltar que como nosso estudo envolveu pacientes assintomáticos nos quais foram realizadas coletas de sorologia sequenciais semanais, associado ao fato de que os anticorpos da classe IgM costumam se tornar positivos a partir de 5 dias da infecção, acreditamos que isto não tenha sido um fator limitante da nossa metodologia.

Tipicamente, a IgM para ZKV começa a se desenvolver cerca de 5-6 dias após o início dos sintomas e pode ser detectada no sangue por até 3 meses<sup>66</sup>.

Entretanto, a detecção de IgM para ZKV pode persistir positiva até 100 dias após o início dos sintomas na maioria da população de um estudo prospectivo publicado<sup>55</sup>.

Outro achado interessante deste mesmo estudo é que esta positividade

não foi alterada nos pacientes que já eram experimentados com infecção por DENV, uma vez que em nosso país ocorre a co-circulação destes agentes.

A produção de IgG para ZKV pode ser detectada a partir do 10º dia da doença clínica e pode persistir por meses a anos. Um achado interessante de um estudo envolvendo pacientes com ZKV foi que a presença de IgG para o mesmo agente foi substancialmente maior nos casos de pacientes com infecção por DENV prévia. Tal estudo até propõe que um elevado nível de IgG para ZIKV durante a infecção pelo agente seja uma maneira útil de identificar pacientes com DENV prévia (um índice > 5 de IgG)<sup>55</sup>.

O IgM para CHKV é tipicamente detectado 3 dias após o início dos sintomas e pode persistir por até 3 meses<sup>66</sup>. Já IgG costuma ser detectada cerca de 14 dias após o início dos sintomas. Nos casos de infecção por DENV, o anticorpo IgM costuma surgir 4 a 5 dias após o aparecimento dos sintomas, tem pico de 6 a 10 dias após, e pode persistir por até 90 dias<sup>67</sup>; enquanto que o anticorpo da classe IgG demora de 1 a 14 dias para poder ser detectado<sup>68</sup>.

É importante destacar que a detecção de IgG DENV no sangue do doador não implica na transmissão do vírus aos receptores. No entanto, a transmissão dessa classe de anticorpos pode aumentar o risco do receptor de desenvolver formas graves da doença, como febre hemorrágica da dengue e/ou síndrome do choque da dengue na infecção por um sorotipo viral diferente. Esses anticorpos heterotípicos de reação cruzada não neutralizantes e parcialmente neutralizantes também podem aumentar a infectividade viral por meio do aprimoramento dependente de anticorpos, o que, por sua vez, tem um impacto negativo nas respostas imunes inatas do hospedeiro<sup>1</sup>.

Uma outra preocupação que tivemos estaria relacionada aos títulos de anticorpos produzidos após uma infecção secundária por arbovírus, uma vez que como nosso país apresenta endemicidade para estes 3 vírus, isto poderia promover numa menor produção de anticorpos nesta infecção secundária e, desta forma, não ser detectada pelas metodologias sorológicas empregadas. Porém, apenas uma pequena parcela da população apresentava IgG reagente para algum dos vírus e, a realização da investigação por biologia molecular de forma concomitantemente mitigou a possibilidade destes achados.

Entretanto, sabemos que os títulos de IgM na infecção primária são significativamente mais elevados do que nas infecções secundárias<sup>58</sup>.

Não encontramos nenhum caso de soroconversão para ZKV e CHKV em

nossa casuística. Apesar de observarmos soroconversão de DENV em alguns pacientes, não evidenciamos nenhuma amostra virêmica nem nos receptores de TCTH e nem nos componentes sanguíneos investigados.

Em decorrência do recente surto de febre amarela em nosso país, autoridades federais conduziram uma campanha vacinal em massa da população do país para esta doença, principalmente pelo fato da epidemia ter ocorrido em áreas não consideradas de risco.

Como a vacina contém vírus atenuado, foi também aventada a possibilidade da ocorrência de reação cruzada de anticorpos da vacina com outros vírus do mesmo gênero, como DENV e ZKV. Entretanto, em nossa casuística, um outro achado promissor foi que apenas 1 paciente dos 16 vacinados para febre amarela apresentou sorologia positiva para ZKV, demonstrando assim baixa reatividade cruzada entre a metodologia usada para análise dos anticorpos e a vacina.

Uma publicação que comparou a possibilidade de reação cruzada entre vacina de febre amarela e anticorpos contra DENV e ZKV e encontrou uma taxa de 3,9%, somente quando utilizado o kit de IgG DENV da FOCUS, que foi o mesmo empregado em nossa casuística<sup>69</sup>.

Outro estudo prospectivo também não encontrou associação de sorologia positiva para ZKV com autorrelato dos pacientes de vacinação prévia para febre amarela<sup>55</sup>. Além disso, outro trabalho não encontrou nenhum caso de paciente com vacina para febre amarela cursando com resultado positivo para ZKV por meio de teste de soroneutralização<sup>60</sup>.

Além disso, a maior parte da nossa população não apresentou sintomatologia como rash cutâneo, manifestações neurológicas, mialgia e artralgia. Alguns apresentaram quadro de febre, porém tal achado é frequentemente encontrado na população pós-TCTH. Isso não exclui que possa ter ocorrido a transmissão da doença no período, uma vez que a maior parte das infecções, especialmente por ZKV, são oligossintomáticas<sup>55</sup>.

Vale a pena destacar que não tivemos nenhuma amostra com NS1 reagente o que é compatível com o não encontro de carga viral detectável, uma vez que o NS1 indicaria uma infecção mais recente, diferentemente, por exemplo, de um resultado de IgM positivo. O NS1 costuma surgir no início dos sintomas e pode perdurar por até 18 dias, entretanto a sua sensibilidade cai nos episódios de dengue secundária<sup>70</sup>.

Como limitações do nosso estudo podemos citar o fato da primeira coleta de amostras de sangue do paciente, ao ser incluído no estudo, poder ocorrer após a infusão das células TCTH o que pode, de certa forma, impactar no resultado das análises de investigação da transmissão transfusional.

Como a inclusão dos pacientes era realizada apenas 1 vez na semana, algum paciente pode ter internado em um período em que houve tempo entre receber o esquema de condicionamento e realizar o TCTH antes da próxima visita do pesquisador para inclusão de novos pacientes. Desta forma, este paciente, além de já ter recebido a infusão das células progenitoras, poderia já ter também sido exposto a algum composto sanguíneo.

Além disso, durante o período do estudo, a enfermaria da população TCTH do HC passou por reforma física, sendo necessária a alocação temporária dos pacientes no ICESP. Devido a isto, a grande maioria dos pacientes incluídos no estudo foi de TCTH autólogo, não sendo severamente imunocomprometidos, o que poderia impactar de forma mais evidente nos cenários de investigação, especialmente relacionado com a produção de anticorpos, exposição de hemocomponentes e imunossupressores.

Além disso, não houve a finalização da investigação dos componentes sanguíneos recebidos, nos casos que apresentaram soroconversão, pela não disponibilidade de kits de IgG para dengue, não sendo possível, desta forma, concluir de forma mais precisa esta análise.

## **12. CONCLUSÕES**

No nosso estudo foram encontrados apenas casos assintomáticos de soroconversão para DENV. Nenhum paciente TCTH apresentou RT-PCR positivo para arbovírus.

A nossa casuística evidenciou que a sorologia poderia ser útil na triagem de pacientes TCTH como avaliação de risco de exposição a DENV, ZKV e CHKV durante e após o transplante.

Os nossos dados também encontraram baixa prevalência de arbovírus, questionando a recomendação da adoção de uma testagem rotineira por meio de RT-PCR dos componentes sanguíneos que serão infundidos em pacientes TCTH.



## 13. ANEXOS

FICHA DE COLETA DE DADOS: será aplicada de maneira longitudinal

### **a)Doador**

RGHC:

Idade:

Bairro:

Profissão:

Vacina febre amarela: ( ) Sim ( ) Não Data:

Viagem no último mês: ( ) Sim ( ) Não

Local e data:

Dengue prévia: ( ) Sim ( ) Não

Data Diagnóstico: ( ) Clínico ( ) Laboratorial

Familiar com Dengue: ( ) Sim ( ) Não Data:

### **b)Receptor**

RGHC:

Nome:

Idade:

Bairro:

Profissão:

Vacina febre amarela: ( ) Sim ( ) Não Data:

Viagem no último mês: ( ) Sim ( ) Não

Local e data:

Dengue prévia: ( ) Sim ( ) Não

Data Diagnóstico: ( ) Clínico ( ) Laboratorial

Familiar com Dengue ( ) Sim ( ) Não Data:

**Tipo de TCTH:**

1( )Autólogo

2( )Alogênico

Aparentado

Não aparentado

**Fonte medula:**

1( ) Sg periférico 2( ) Medula 3( ) Cordão

**Doença de base:**

( ) LMA

( ) Aplasia

( ) LH

( ) MM

( ) LNH

**Condicionamento**

Mieloablativo     Não mieloablativo

**Profilaxia GVHD:****GVHD:**

1  Sim    2  Não

Agudo

Crônico

TGI     Pele     Pulmão     Fígado

**Tratamento GVHD:**

Corticoide: dose    data

Outras drogas:

ATG:

**Sintomas arbovirose:**

1  Febre

2  Rash

Maculopapular

Petequial

3  Mialgia    4  Conjuntivite    5  Artralgia / Artrite

6( ) Elevação de enzimas hepáticas

Data:\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

AST:\_\_\_ ALT:\_\_\_ GGT:\_\_\_ FA:\_\_\_\_\_

( ) > 3 vezes o LSN

( ) < 3 vezes o LSN

7( ) Hemograma (realizado de forma longitudinal)

Data:\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

( ) Leucopenia Numero Leucocitos:-----

( ) Linfopenia Numero Linfocitos:\_\_\_\_\_

( ) Neutropenia Numero neutrófilos:\_\_\_\_\_

( ) Plaquetopenia Numero de plaquetas:\_\_\_\_\_

CPK:\_\_\_\_\_ Data:\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Coagulograma:\_\_\_\_\_ data:\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

( ) Sintomas neurológicos

Data:\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

( ) Encefalite

( ) Meningite

( ) Neuropatia periférica

**Data início sintomas:**

Tempo TCTH sintomas (dias):

Tempo sintomas-diagnóstico (dias):

Tempo TCTH-diagnóstico (dias):

Tempo diagnóstico-início tratamento (dias):

**Sorologias:**

Sorologia dengue ( ) Positiva ( ) Negativa

Título IgM: Título IgG: Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

NS1 dengue ( ) Positivo ( ) Negativo

Sorologia Chikungunya ( ) Positiva ( ) Negativa

Título IgM: Título IgG: Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Sorologia Zika ( ) Positiva ( ) Negativa

Título IgM: Título IgG: Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**PCR**

1( ) Positivo 2( ) Negativo

Material PCR

1( ) Sangue    2( ) Urina    3( ) Liquor

Nº PCR+/Nº PCR TESTADOS

Classificação

1( ) Possível    2( ) Provável    3( ) Provado

CD4

1( ) <100    2( ) 100-350    3( ) >350

Tratamento

1( ) Sim    2( ) Não

Desfecho

1( ) Cura    2( ) Morte

Tempo tx-óbito (dias):

**c)Screening das bolsas de hemoderivados**

Sorologia dengue    ( ) Positiva ( ) Negativa

Título IgM:    Título IgG:    Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

NS1 dengue ( ) Positivo ( ) Negativo

Sorologia Chikungunya ( ) Positiva ( ) Negativa

Título IgM: Título IgG: Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Sorologia Febre Amarela ( ) Positiva ( ) Negativa

Título IgM: Título IgG: Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

PCR ( ) Positivo ( ) Negativo

Carga viral dengue hemocomponente:

Carga viral Zika vírus hemocomponente:

Carga viral Chikungunya hemocomponente:

## 14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wahab E, Elfiky KSR, Ghanem MA, et al. **Assessment of dengue virus threat to blood safety and community health: a single center study in northern Egypt.** Journal of Virus Eradication 8, 2022
2. Boletim Epidemiológico Número 24 – Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 24 de 2022** – publicado em 04/08/2022
3. Coordenadoria de Vigilância em Saúde – COVISA/SMS. Dados Epidemiológicos de Dengue – acessado em 14/08/2022
4. Wiwanitki S, Wiwanitkit V. **Based on the risk of dengue virus transmission via blood transfusion: What about the risk in case of Zika virus?** Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2016
5. Sutherland MR, Simon AY, Serrano K, Schubert P, Acker JP, Pryzdial EL. **Dengue virus persists and replicates during storage of platelet and red blood cell units.** Transfusion 2016
6. OH HB, et al. **Bitten by a bug or a bag? Transfusion-transmitted dengue: a rare complication in the bleeding surgical patient.** Transfusion 2015
7. Tambyah PA, et al. **Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion.** N Engl J Med 2008; 359:1526–7
8. Stramer SL, Linnen JM, Carrick JM, 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; 52:1657–66



9. Raj ARR, Shashindran N, Shenoy V, et al. **Dengue Seropositivity among Blood Donors in a Tertiary Hospital in Kerala, Southern India.** Ann Afr Med, 2022
10. Levi JE et al. **Real-time symptomatic case of transfusion transmitted dengue.** Transfusion 2015; 55:961–4
11. Levi JE. **Dengue Virus and Blood Transfusion.** J Infect Dis 2016; 213(5): 689-90.
12. Sabino EC, Loureiro P, Lopes ME, Capuani L, McClure C, Chowdhury D, Di- Lorenzo-Oliveira C, Oliveira LC, Linnen JM, Lee TH, Gonzalez T, Brambilla D, Kleinman S, Busch MP, Custer B; International Component of the NHLBI Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study-III. **Transfusion- Transmitted Dengue and Associated Clinical Symptoms During the 2012 Epidemic in Brazil.** J Infect Dis 2016; 213(5): 694-702
13. Katz LM, Rossmann SN. **Zika and the Blood Supply.** Arch Pathol Lab Med 2017; 141:85-92
14. Slavov SN, Hespanhol MR, et al. **Zika virus RNA detection in asymptomatic blood donors during an outbreak in the northeast region of Sao Paulo State, Brazil, 2016.** Transfusion 2017; 00: 00-00
15. Patterson J, Sammon M, Garg M. **Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World.** Western Journal of Emergency Medicine, 2016
16. Charrel RN, et al. **Background review for diagnostic test development for Zika virus infection.** Bull World Health Organ 2016; 94: 574-584
17. Lessier J, Ott CT, Carcelen AC, et al. **Times to key events in Zika virus infection and implications for blood donation: a systematic review.** Bull World Health Organ 2016; 94: 841-849

18. Motta IJF, Spencer BR. **Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion.** N Engl J Med 2016
19. Castro MLB, Angerami RN, Cunha MS. **Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil.** Transfusion 2016
20. Anez G, 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
21. Appassakij H, et al. **The risk of blood transfusion-associated Chikungunya fever during the 2009 epidemic in Songkhla Province, Thailand.** Transfusion 2014; 54(8):1945-52
22. Oei W, Janssen MP, van der Poel CL, van Steenbergen JE, Rehmet S, Kretzschmar ME. **Modeling the transmission risk of emerging infectious diseases through blood transfusion.** Transfusion 2013; 53(7):1421-8
23. Liunbruno GM, et al. **The Chikungunya epidemic in Italy and its repercussion on the blood system.** Blood Transfus 2008; 6(4):199-210
24. Vishuthranukul J, et al. **Dengue hemorrhagic fever in a peripheral blood stem cell transplant recipient: the first case report.** Infectious Disease Reports 2009
25. Machado CM, et al. **Epidemiology of Neglected Tropical Diseases in Transplant Recipients. Review of the Literature and Experience of a Brazilian HSCT Center.** Rev. Inst. Med. Tropical 2009; 51(6): 309-324
26. Pereira BBS, et al. **Prolonged viremia in dengue virus infection in hematopoietic stem cell transplant recipients and patients with hematological malignancies.** Transpl Infect Dis 2017; 19(4)

27. Barroso KSN, et al. **Dengue encephalitis in allogenic hematopoietic stem cell transplantation recipient.** Bone Marrow Transplantation 2017; 1-2
28. Punzel M, et al. **Dengue virus transmission by blood stem cell donor after travel to Sri Lanka; Germany, 2013.** Emerg Infect Dis 2014; 20(8):1366-9
29. Andrade PP, et al. **Use of transgenic Aedes aegypti in Brazil: risk perception and assessment.** Bull World Health Organ 2016; 94:766-771
30. **Elegibilidade para Doação de Sangue: Recomendações para Educação e Seleção de Doadores de Sangue Potenciais.** Organização Pan-americana de Saúde, 2009
31. Portaria 158 de 4 fevereiro de 2016. **Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos.** Ministério da Saúde
32. Keeping Blood Transfusions Safe: FDA's Multi-layered Protections for Donated Blood, 2018
33. **Manejo de Infecções em Transplante de Células Tronco-hematopoéticas.** Consenso SBTMO, 2015
34. Peters R, Stevenson, M. **Zika Virus Diagnosis: challenges and solutions.** Clinical Microbiology and Infection, 2018
35. World Health Organization. **Laboratory Testing for Zika virus Infection: interim guidance.** World Health Organization, 2016
36. Jaaskelainen AJ, et al. **Validation of Serological and Molecular Methods for Diagnosis of Zika virus Infections.** Journal of Virological Methods, 2019 68-74
37. Bittar C, Machado RRG, et al. **Lack of serological and molecular evidence of arbovirus infections in bats from Brazil.** PLoS ONE, 2018; 13 (11)

38. Vogels CBF, Ruckert C, Cavany SM. **Arbovirus coinfection and co- transmission: A neglected public health concern?** PLoS Biol, 2019 17(1): e3000130
39. Carvalho FR, Medeiros T, Vianna RAO, et al. **Simultaneous circulation of Arboviruses and Other Congenital Infections in Pregnant Women in Rio de Janeiro, Brazil.** Acta Tropica, 2019
40. Casos de Dengue, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1998 a 2019 – Ministério da Saúde
41. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 2018: volume 49, número 51
42. Lopes TRR, et al. **Dengue in Brazil in 2017: what happened?** Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine, 2018
43. Figueiredo LTM. **Has the threat of Zika virus outbreaks come to an end?** Rev Soc Bras Med Trop, 2018; 51 (3): 259-260
44. Benites BD, et al. **Zika virus and the safety of blood supply in Brazil: a retrospective epidemiological evaluation.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2018
45. Magnus MM, et al. **Risk of Zika virus transmission by blood donations in Brazil.** Hematol, Transfus Cell Therapy, 2018; 40(3): 250-254
46. Slavov SN, et al. **Zika virus RNA detection in asymptomatic blood donors during an outbreak in the northeast region of Sao Paulo State, Brazil, 2016.** Transfusion 2017;00;00-00
47. Costa SSB, et al. **Spatial analysis of probable cases of dengue fever, chikungunya**

**fever and zika virus infections in Maranhao State, Brazil.** Rev Inst Med Trop São Paulo, 2018; 60: e62

48. Sacchetto L, et al. **Screening for Zika virus RNA in sera of suspected cases: a retrospective cross-sectional study.** Virology Journal, 2018; 15: 155

49. Barraquer IS, et al. **Impact of preexisting dengue immunity on Zika virus emergence in a dengue endemic region.** Science, 2019; 607-610

50. Fisher C, Pedroso C, Junior AM, et al. **External quality assessment for Zika Virus Molecular Diagnostic Testing, Brazil.** Emerging Infectious Disease, 2018; 24(5)

51. Barzon L, et al. **Virus and antibody dynamics in travelers with acute Zika virus infection.** Clinical Infectious Disease, 2017; XX:1-8

52. Junior LGD, Carvalho AMS, Machado CM. **Chikungunya, Dengue and Zika in Immunocompromised Hosts.** Current Infectious Disease Reports, 2018; 20:5

53. Calvet GA, et al. **Study on the persistence of Zika virus (ZIKV) in body fluids of patients with ZIKV infection in Brazil.** BMC Infectious Disease 2018; 18:49

54. Joquet G. **Effect of acute Zika virus infection on sperm and virus clearance in body fluids: a prospective observational study.** Lancet Infect Dis, 2017; 17:1220-08

55. Sahly HM, Gorchakov R, Lai L, et al. **Clinical, Virologic and Immunologic Characteristics of Zika Virus Infection in a Cohort of US Patients: Prolonged RNA Detection in Whole Blood.** Open Forum Infectious Diseases, 2018

56. Mansuy JM. **Zika virus infection and prolonged viremia in whole-blood specimens.** Emerg Infect Dis, 2017

57. Lessler J, Ott CT, Carcelen AC, et al. **Times to key events in Zika virus infection and implications for blood donation: a systematic review.** Bull World Health Organ 2016; 94: 841-849
58. Paula SO, Fonseca BAL. **Dengue: a review of the Laboratory Tests a Clinician Must Know to Achieve a Correct Diagnosis.** The Brazilian Journal of Infectious Diseases 2004; 8(6): 390-398
59. Mehta R, Soares CN, et al. **The spectrum of neurological disease associated with Zika and Chikungunya viroses in adults in Rio de Janeiro, Brazil: A case series.** PLoS Negl Trop Dis, 2018
60. Nurtop E, Villarroel PMS, Pastorino B, et al. **Combination of ELISA screening and seroneutralisation tests to expedite Zika virus seroprevalence studies.** Virology Journal, 2018
61. Centers for Disease Control and Prevention. **Guidance for U.S laboratories testing for Zika virus infection.** Centers for Disease Control and Prevention, 2016
62. Pasquier C, et al. **Kinetics of anti-ZIKV antibodies after Zika infection using two commercial enzyme-linked immunoassays.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2018; 26-30
63. Huiller AGL, et al. **Evaluation of Euroimmun anti-Zika Virus IgM and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Zika Virus Serologic Testing.** Journal of Clinical Microbiology, 2017
64. Steinhagen K, et al. **Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016.** Euro Surveil, 2016

65. Granger D, et al. **Serologic testing for Zika virus: comparison of Three Zika Virus IgM-Screening Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Initial Laboratory Experiences.** Journal of Clinical Microbiology, 2017; 55:2127-2136
66. Pinheiro TJ, Guimaraes LF, et al. **Neurological manifestations of Chikungunya and Zika Infections.** Arq Neuropsiquiatr 2016; 74(11): 937- 943
67. Hungsperger EA, et al. **Performance of Dengue Diagnostic Tests in a Single-Specimen Diagnostic Algorithm.** The Journal of Infectious Diseases 2016; 214: 836-44
- Ahmed NH, Broor S. **Comparison of NS1 antigen detection ELISA, real-time RT-PCR and virus isolation for rapid diagnosis of dengue infection in acute phase.** J Vector Borne 2014; 51: 194-199
68. Sousa NCS, Clara FA, Eduardo LJ, et al. **Evaluation of serologic cross reactivity between Yellow Fever and other flaviviruses.** Internation Journal of Infectious Diseases, 2019
69. Xu H, Di B, Pan YX, et al. **Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections.** J Clin Microbiol, 2006
70. Buonora SN, et al. **Increased sensitivity of NS1 ELISA by heat dissociation in acute dengue 4 cases.** BMC Infectious Diseases, 2017 17:204