

SANNY MARCELE DA COSTA LIRA

**Avaliação da prevalência de viremia do zika vírus em doadores
de sangue do Hospital Israelita Albert Einstein no período de
maio de 2016 a maio de 2018**

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

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Dr. José Eduardo Levi

São Paulo

2021

SANNY MARCELE DA COSTA LIRA

Avaliação da prevalência de viremia do zika vírus em doadores de sangue do hospital israelita Albert Einstein no período de maio de 2016 a maio de 2018

Versão Corrigida

A versão original se encontra disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

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

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Dr. José Eduardo Levi

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lira, Sanny Marcele da Costa

Avaliação da prevalência de viremia do zika vírus em doadores de sangue do hospital israelita Albert Einstein no período de maio de 2016 a maio de 2018 / Sanny Marcele da Costa Lira. -- São Paulo, 2020.

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

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: José Eduardo Levi.

Descritores: 1.Zika vírus 2.Flavivirus 3.Doadores de sangue 4.Reação em cadeia da polimerase em tempo real 5.Transfusão de sangue 6.Segurança do sangue

USP/FM/DBD-027/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre me deram apoio durante minha vida acadêmica e profissional, não mediram esforços para oferecer a mim e aos meus irmãos as oportunidades de estudo e especialmente, por terem me dado todo o amor e carinho em todas as fases da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador José Eduardo Levi pela sua disponibilidade, orientação e compartilhamento de conhecimentos e experiências que enriqueceram este trabalho.

Ao Dr. José Mauro Kutner pelas oportunidades, confiança e empenho em garantir que este trabalho pudesse ser realizado de forma completa e ética.

Às minhas amigas Carolina Bub, Andrea Kondo, Araci Sakashita, Ana Paula Yokoyama e Aline de Souza que possibilitaram o cumprimento da minha jornada de aulas durante a pós-graduação e que são meu exemplo de profissionalismo e de equipe.

A todos os funcionários do Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular do Hospital Israelita Albert Einstein pela colaboração, parceria e especialmente à equipe do Laboratório de Sorologia que participou em tempo integral deste trabalho: Silvia Altman, Maria de Lourdes Farinha, Kátia Bringer, Syomara Azevedo, Simone Oliveira, Thiago Costa, Leandro Dinalli e Maria Giselda Aravecchia.

Ao meu esposo Frederico pela paciência e compreensão durante a nossa caminhada. Pelo amor e carinho que destina a nossa família.

Ao meu filho Felipe, que realizou meu sonho de ser mãe e me fez enxergar o real sentido da vida.

E a Deus por me oferecer todos os dias novas oportunidades de conhecimento e aperfeiçoamento pessoal e profissional.

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

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

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

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

SUMÁRIO

LISTAS DE ABREVIATURAS

LISTAS DE SÍMBOLOS

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Histórico e propagação do zika vírus.....	18
1.2 Estrutura do zika vírus.....	21
1.3 Formas de transmissão do zika vírus.....	25
1.4 Manifestações clínicas da infecção pelo Zika vírus.....	26
1.5 Zika Vírus e Transfusão de Sangue.....	28
1.6 Medidas de prevenção contra transmissão transfusional do zika vírus.....	30
1.6.1 Tecnologia de inativação de patógenos.....	33
1.6.2 Testes laboratoriais para detecção do zika vírus.....	36
1.6.2.1 Métodos sorológicos.....	37
1.6.2.2 Métodos moleculares.....	39
2 JUSTIFICATIVA.....	43

3 OBJETIVOS.....	45
3.1 Objetivos secundários.....	45
4 MÉTODOS.....	46
4.1 Critérios de inclusão do estudo.....	47
4.2 Considerações éticas.....	47
4.3 Extração do RNA do zika vírus.....	47
4.4 RT-PCR em tempo real para detecção do RNA do zika vírus.....	50
4.4.1 Análise do limite de sensibilidade do RT-qPCR para detecção do RNA do zika vírus.....	53
4.4.2 Análise da especificidade do RT-qPCR para detecção do RNA do zika vírus.....	54
4.5 Participação em teste de proficiência externo de diagnóstico molecular para o zika vírus.....	54
4.6 Pesquisa de anticorpos ZIKV do tipo IgG.....	56
4.7 Pesquisa de anticorpos DENV do tipo IgG.....	57
4.8 Pesquisa de anticorpos ZIKV do tipo IgM.....	58
5 RESULTADOS.....	60
5.1 RT-PCR em tempo real para detecção do RNA do zika vírus.....	61
5.2 Pesquisa de anticorpos ZIKV do tipo IgG, DENV do tipo IgG e ZIKV do tipo IgM.....	63
6 DISCUSSÃO.....	65
7 CONCLUSÕES.....	74
8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	75

9 ANEXOS.....	76
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

cols.	colaborador(es)
ex.	exemplo
fig.	figura

LISTA DE SIMBOLOS

h	hora
kb	kilobases
m	metro
µL	microlitro
mL	mililitro
µM	micromolar
n ^o	número
nm	nanômetro
pb	pares de bases
rpm	rotações por minuto
s	segundo
°C	grau Celsius
>	maior que
<	menor que
=	igual a

LISTA DE SIGLAS

AABB	<i>American Association of Blood Banks</i>
------	--

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCA	<i>Cross Reaction Control Antigen</i>
CCS	<i>Cell Culture Supernatant</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
CHKV	Chikungunya Vírus
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
DENV	Dengue Vírus
DF	<i>Dengue Hemorrhagic Fever</i>
DSS	<i>Dengue Shock Syndrome</i>
DHTC	Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular
DO	Densidade Óptica
DP	Desvio-Padrão
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HBV	<i>Hepatitis B virus</i>
HCV	<i>Hepatitis C virus</i>
HIAE	Hospital Israelita Albert Einstein
HIV	<i>Human Immunodeficiency virus</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IIFIT	<i>Indirect Immunofluorescence</i>
IgA	Imunoglobulina A

IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
IND	<i>Investigational New Drug Application</i>
IP	Inativação de Patógenos
IPD	Informação Pós-Doação
ISBT	<i>International Society of blood Transfusion</i>
MAC-ELISA	<i>IgM Antibody Capture Enzyme-linked immunosorbent Assay</i>
MS	Ministério da Saúde
NAT	<i>Nucleic Acid Amplification Test</i>
NAT-ID	Teste de Ácidos Nucléicos Individual
NAT-MP	Teste de Ácidos Nucléicos em Mini-pool
NCA	<i>Normal Antigen Control</i>
NCR	<i>Noncoding Region</i>
NS1	<i>Non-structural Protein</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PRNT	<i>Plaque Reduction Neutralization Test</i>
PV	Poliovírus
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RN	Rio Grande do Norte
RNA	Ácido Ribonucléico
RT	<i>Reverse Transcriptase</i>

RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RT-qPCR	<i>Reverse-transcriptase real-time polymerase chain reaction</i>
RTU	<i>Ready To Use Recombinant Antigens</i>
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
TMA	<i>Transcription-Mediated Amplification</i>
TMO	Transplante de Medula Óssea
TT	Transmissão Transfusional
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UVA	Luz Ultravioleta A
WNV	<i>West Nile Virus</i>
YFV	<i>Yellow Fever Virus</i>
ZIKV	Zika Vírus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do genoma do zika vírus.....	22
Figura 2. Representação da estrutura do zika vírus.....	23
Figura 3. Representação das linhagens asiática e africana do zika vírus.....	24
Figura 4. Ciclos de vida silvestre e urbano do zika vírus.....	26
Figura 5. Estrutura química do amotosaleno e mecanismo de ação.....	35
Figura 6. Curso da infecção pelo zika vírus e o aparecimento dos principais marcadores sorológicos.....	38

Figura 7. Inicializadores e sondas descritos na literatura e utilizados para detecção do zika vírus através do RT-PCR em tempo real	40
Figura 8. Resumo dos principais RT-PCR descritos e tipos de amostras usadas para detectar o RNA viral nos casos humanos.....	41
Figura 9. Esquema do princípio de extração do RNA viral do equipamento QIASymphony (Qiagen).....	49
Figura 10. Princípio da amplificação do <i>QuantiNovaProbe RT-PCR kit</i>	53
Figura 11. Resultados dos testes de proficiência externos para diagnóstico molecular para o zika vírus em 15 laboratórios no Brasil.....	55
Figura 12. Performance dos laboratórios participantes do teste de proficiência..	56
Figura 13. Princípio do método de ELISA indireto para detecção do ZIKV IgG.....	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva de amplificação e resultados para o zika vírus.....	62
Gráfico 2. Curva de amplificação e resultados para o póliovírus.....	63
Gráfico 3. Casos prováveis de febre pelo zika vírus por semana epidemiológica do início dos sintomas.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das principais tecnologias de inativação de patógenos disponíveis em 2020.....	36
Tabela 2. Sonda e par de inicializadores senso e anti-senso utilizados no PCR em real time para o zika vírus.....	50
Tabela 3. Sonda e par de inicializadores e utilizadas no PCR em tempo para póliovírus.....	51
Tabela 4. Preparação do MasterMix com volumes de reagentes utilizados para montagem da PCR.....	51

Tabela 5. Resultados obtidos para o cálculo de limite de detecção do teste através de <i>Probit Analysis</i>	54
Tabela 6. Distribuição das amostras por mês de coleta nos anos de 2016, 2017 e 2018.....	60
Tabela 7. Distribuição dos doadores participantes do estudo quanto às variáveis: sexo, faixa etária, tipo de doador e produto coletado.....	61
Tabela 8. Resultados dos testes de avaliação da soroprevalência do zika vírus e interpretação: ZIKV RNA, IgG ZIKV (Euroimmun), IgG DENV (Panbrio), IgM ZIKV(Inbios-ISR), IgM ZIKV (Inbios-CCA/NCA)	64
Tabela 9. Distribuição dos testes de sorologia IgG ZIKV IgG por mês.....	64

Resumo

Lira SMC. *Avaliação da prevalência de viremia do zika vírus em doadores de sangue do Hospital Israelita Albert Einstein no período de maio de 2016 a maio de 2018* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

INTRODUÇÃO: O zika vírus (ZIKV) é um vírus de RNA pertencente ao gênero *Flavivirus* e foi inicialmente isolado na Floresta Zika, Uganda em 1947. A ocorrência de algumas epidemias ao redor do mundo demonstrou que a presença de doadores de sangue virêmicos assintomáticos proporciona um aumento do risco de transmissão transfusional (TT). Embora o curso clínico das infecções adquiridas por transfusão nos receptores de sangue ainda seja desconhecido, a triagem de doadores através dos testes de ácidos nucleicos (NAT) é uma alternativa importante na manutenção da segurança transfusional. Neste estudo desenvolvemos, validamos e implementamos um teste de NAT *in house* para detecção do RNA do zika vírus em amostras de doadores de sangue do Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular do Hospital Israelita Albert Einstein. **MÉTODOS:** Tubos primários de plasma provenientes de candidatos à doação de sangue foram submetidos à extração do RNA em uma plataforma automatizada. São utilizados inicializadores e sondas para o ZIKV e para o póliovírus (PV) que funciona como o controle interno da reação, em uma reação duplex. O controle positivo utilizado é um sobrenadante de cultura de ZIKV da linhagem asiática e os controles negativos são amostras de plasma de doadores previamente testados para ZIKV. A reação de cadeia de polimerase em tempo real foi realizada em um termociclador utilizando o protocolo estabelecido pelo fornecedor. **RESULTADOS:** Entre maio de 2016 e maio de 2018, 3.369 amostras foram coletadas de 3.221 doadores de sangue (intervalo de confiança, 95%; supondo a prevalência do ZIKV RNA de 5%); 31 (0,92%) foram consideradas falso positivas, pois não foram confirmadas reatividades na repetição em duplicata, 14 amostras (0,42%) apresentaram resultado inválido devido às falhas nos controles internos, 4 (0,12%) tiveram volume insuficiente de amostra e em duas (0,05%) houve falha no pipetador automático. Nenhuma amostra foi positiva para o RNA do zika vírus. **CONCLUSÕES:** Foi possível validar e determinar as características analíticas da metodologia aplicada que se mostrou factível em sua utilização na rotina de triagem laboratorial de doadores de sangue. Este método representa uma alternativa para garantir a segurança transfusional durante epidemias do zika vírus. Não foi identificada nenhuma amostra positiva para o ZIKV RNA, em concordância com o pequeno número de casos autóctones na cidade de São Paulo durante o período do estudo.

Descritores: Zika vírus; Flavivirus; Doadores de sangue; Reação em cadeia da polimerase em tempo real; Transfusão de sangue; Segurança do sangue.

Abstract

Lira SMC. *Prevalence of zika virus RNA in blood donors at Albert Einstein hospital from may, 2016 to may, 2018* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

INTRODUCTION: Zika Virus (ZIKV) is a single stranded RNA genome virus, positive-sense, non-segmented, belonging to the family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus* and it was initially isolated in the Zika Forest, Uganda in 1947. During the occurrence of some outbreaks around the world, the presence of asymptomatic viremic blood donors have been demonstrated, posing a risk for its transfusion transmission (TT). While the clinical outcome of TT zika is unknown and unpredictable, nucleic acid test (NAT) screening has been proposed to ensure the blood safety. This study developed, validated and implemented an “in-house” method to detect zika RNA in blood samples donations from the Hemotherapy and Cell Therapy Department at Hospital Israelita Albert Einstein. **METHODS:** Primary plasma tubes from donors were submitted to nucleic acid extraction on an automated platform. An amplification mixture containing primers and probes for zika and Polio vaccine virus (PV), as an internal control, in duplex, are added. The positive control of the reaction of a ZIKV culture supernatant from the Asian lineage and negative controls were plasma samples from donors previously tested for ZIKV. Real-Time polymerase chain reaction is then performed in a thermocycler using the protocol established by the amplification mixture supplier. **RESULTS:** From May 2016 to May 2018, 3,369 samples were collected from 3,221 blood donors (confidence coefficient, 95%; supposed ZIKV RNA prevalence, 5%), 31 (0.92%) were considered false positive since they did not confirm initial reactivity when repeated in duplicates, 14 (0.42%) had their results invalid due to repeat failure in the internal control, 4 (0.12%) volume insufficient sample and 2 (0.05%) automatic pipettor failures. No zika RNA reactive sample was identified. **CONCLUSION:** It was possible to determine the analytical characteristics of the developed method and the test showed feasible to be incorporated into the blood screening routine. This method represents an alternative to warrant the safety of the blood supply during zika virus epidemics. No zika RNA+ donation was detected in our screening blood donors routine what can be correlated to the very low number of autochthonous zika cases in São Paulo city during the study period. However, a generic NAT system covering a group of flaviviruses which are circulating in the region such as ZIKV, DENV and YFV among others, could be an useful tool.

Descriptors: Zika virus; Flavivirus; Blood donors; Real-time polymerase chain reaction; Blood transfusion; Blood safety.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico e propagação do zika vírus

O zika vírus (ZIKV) foi isolado pela primeira vez em abril de 1947 em amostras de sangue de macacos Rhesus da floresta Zika em Uganda durante estudos sobre a febre amarela. Recebeu o nome de zika vírus devido a região onde foi inicialmente descrito e a cepa foi denominada de ZIKV 766 em referência ao macaco sentinela nº 766 do qual foi isolado. No ano seguinte, o vírus foi isolado em mosquitos *Aedes africanus* coletados na mesma região(1) e a cepa foi denominada ZIKV E/1(2).

A primeira descrição do vírus em humanos aconteceu na Nigéria em 1953 durante uma epidemia de icterícia. Uma criança de 10 anos foi diagnosticada com a doença através do isolamento viral e posteriormente outros dois pacientes foram identificados através da presença de anticorpos neutralizantes do ZIKV em seus soros(3).

Durante os cinquenta anos seguintes, apenas quatorze casos de doença clínica foram descritos em regiões nigerianas(4, 5), no Senegal(6) e na Indonésia(7) até que em 2007, foi descrita a primeira epidemia ocorrida no Estado de Yap, um dos quatro estados da Federação da Micronésia localizados no Oceano Pacífico Ocidental. Médicos relataram casos de pacientes com erupções cutâneas maculares ou papulares, dores articulares e conjuntivite não-purulenta, o que era incomum nos quadros de dengue previamente diagnosticados. A

investigação resultou na identificação de quarenta e nove pacientes confirmados pelo ZIKV através de estudos moleculares e sorológicos realizados pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos da América (EUA). Estima-se que 73% da população foi afetada durante a epidemia, porém não foram descritas hospitalizações, manifestações hemorrágicas ou mortes atribuídas à infecção(8).

Em outubro de 2013, três pacientes da mesma família residentes da Polinésia Francesa, território francês localizado no Oceano Pacífico Sul, apresentaram um quadro clínico leve com dores articulares em punhos e mãos, cefaleia, erupções cutâneas e febre baixa (temperatura < 38^oC). Os testes moleculares realizados foram negativos para o vírus da Dengue (DENV), vírus do Oeste do Nilo (WNV, do inglês *West Nile Virus*), Chikungunya (CHKV) e ZIKV. Após três semanas, outro paciente reportou sintomas semelhantes e foi confirmada infecção pelo ZIKV através da metodologia molecular de transcriptase reversa seguida por reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Concomitantemente, o Ministério da Saúde (MS) da Polinésia Francesa reportou um aumento do número de casos suspeitos de ZIKV e estima-se que ao final da epidemia aproximadamente trinta mil pacientes desenvolveram a doença, o que correspondeu a 11,5% da população, sendo trezentos destes casos confirmados através da detecção do ácido ribonucléico (RNA) viral. Por meio de análises filogenéticas, foi demonstrada a semelhança das cepas do ZIKV encontradas na Polinésia Francesa com as descritas na Micronésia e no Camboja(9). Durante esta epidemia, casos de síndrome de Guillain-Barré temporalmente associados às infecções pelo ZIKV foram descritos com forte correlação causal(10).

Após a epidemia da Polinésia Francesa, inúmeros casos foram descritos em outras ilhas do Oceano Pacífico como Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha da Páscoa(11).

No continente americano, o Brasil foi o primeiro país a comprovar a circulação do vírus em março de 2015 através de amostras coletadas de pacientes das cidades de Natal, estado do Rio Grande do Norte(12)e Camaçari localizada no estado da Bahia(13). A infecção expandiu rapidamente e em dezembro de 2015, pelo menos dezoito dos vinte e três estados brasileiros haviam confirmado casos autóctones da transmissão viral com estimativa de 440.000 a 1.300.000 casos suspeitos, sendo desconhecido o real número de casos(14).

Suspeita-se que o ZIKV possa ter chegado ao Brasil através de expectadores da Copa do Mundo de 2014(15) apesar de seleções de países do Pacífico onde havia circulação do ZIKV não terem participado da competição. Outra hipótese levantada sugere que o vírus possa ter sido trazido por competidores da Polinésia Francesa que estiveram em agosto de 2014 na cidade do Rio de Janeiro para uma competição de canoagem(16). Estudos filogenéticos dos isolados de ZIKV do Brasil demonstraram semelhança com a linhagem asiática e descritas previamente em cepas da Polinésia Francesa, reforçando a hipótese de que o vírus pode ter sido introduzido no Brasil através de viajantes polinésios.

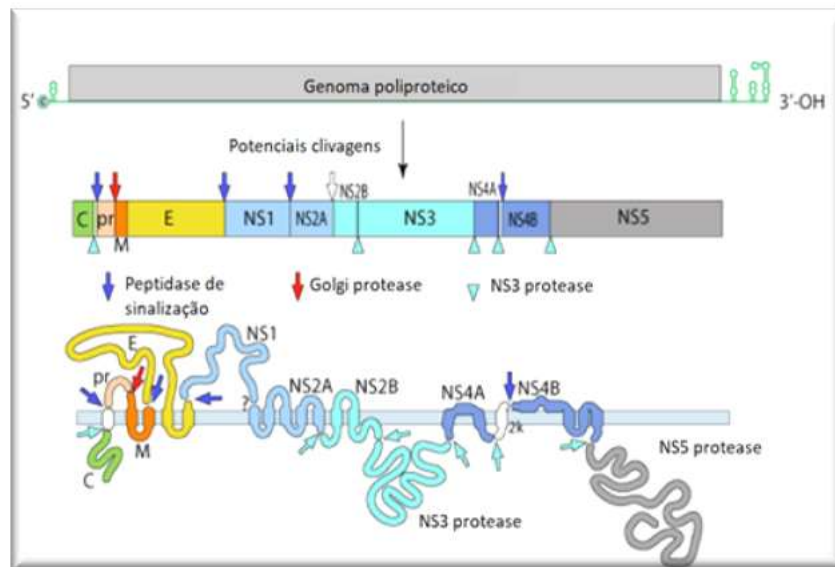
Nos meses seguintes após a notificação da epidemia no Brasil, vários países da América Latina como Colômbia(17), México(18), Paraguai, Ilhas do Caribe(19)e Porto Rico(20) descreveram casos autóctones. Em seguida os

EUA(21) e países europeus como Alemanha(22), Itália(23) e Espanha(24), descreveram casos importados provenientes de viajantes.

Outras epidemias aconteceram entre 2016 e 2018 no continente africano e asiático(25-27) até que circulação do vírus começou a regredir e em 2018 havia baixo nível de circulação mundial(28).

1.2 Estrutura do zika vírus

O ZIKV é um vírus envelopado com diâmetro entre 30-45nm e composto por um genoma de RNA fita simples, senso positivo não segmentado. Seu genoma de aproximadamente 11kb possui duas regiões não codificadoras (5'NCR e 3' NCR) com uma estrutura "cap" na extremidade 5' formada pela metilação da guanina no N-7 e uma ribose na posição 2'-OH(m⁷GpppAmp). A extremidade 3' tem uma estrutura de *loop* que permite a formação de uma unidade subgenômica de RNA importante na patogenicidade viral (Figura 1).

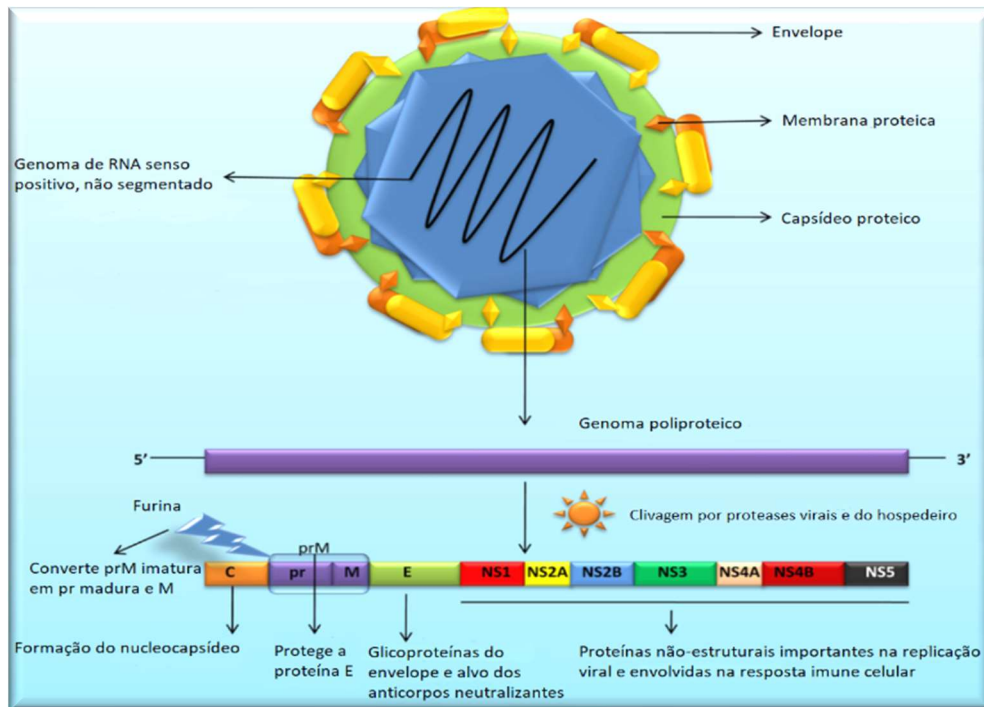


FONTE: adaptado de *Viralzone website*(disponível em: www.viralzone.expasy.org.)

Figura 1. Representação do genoma do zika vírus. O genoma viral é composto de uma partícula linear de RNA senso positivo com aproximadamente 11.000 nucleotídeos. A extremidade 5' possui a estrutura “cap” e a extremidade 3' forma uma estrutura de *loop* e que permite a formação de uma segunda estrutura subgenômica RNA.

O genoma de fase aberta de leitura (ORF, do inglês *Open Reading Frame*) codifica dez poliproteínas com aproximadamente 3.500 aminoácidos, sendo 3 proteínas estruturais: capsídeo(C), complexo pré-membrana/membrana(prM) e envelope(E) e sete não-estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5. Cada uma destas proteínas possui funções específicas importantes para o ciclo de vida do vírus. A proteína C ou core forma o capsídeo viral, o complexo proteína prM protege a proteína E de ser degradada durante a sua formação e este complexo quando clivado em proteínas pr madura e M pela enzima furina, permite a mudança de conformação de superfície e liberação do vírus pela célula hospedeira; a proteína E é a glicoproteína constituinte do envelope viral e atua como alvo para anticorpos neutralizantes além de permitir a ligação e fusão do

vírus à membrana da célula hospedeira. As proteínas não-estruturais estão envolvidas na replicação e resposta imune celular(29). A estrutura do zika vírus está demonstrada na Figura 2.

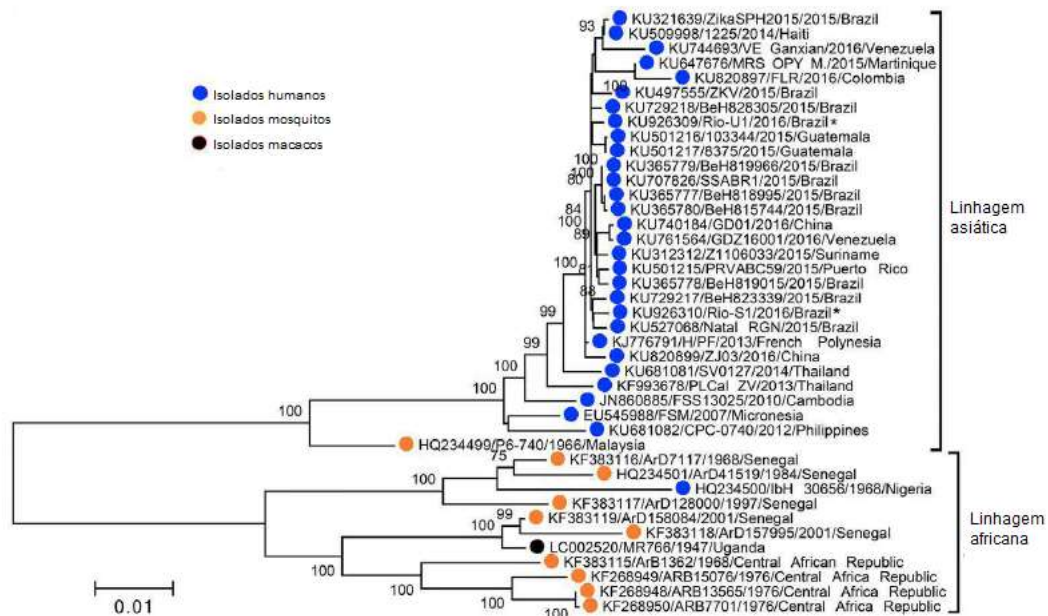


FONTE: adaptado de Singh Raj(29), 2016

Figura 2. Representação da estrutura do zika vírus. Descreve a estrutura física viral com os componentes do envelope, membrana proteica, capsídeo viral e material genético composto de RNA sensado positivo não segmentado. O genoma viral produz três proteínas estruturais: capsídeo ou core (C), complexo pré-membrana/membrana (prM), envelope (E) e sete não-estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 que exercem funções específicas.

O sequenciamento completo do genoma viral foi realizado em 2007(30) e está disponível no *website* do *GenBank*. Sua análise filogenética realizada através da região ORF identificou duas linhagens distintas: africana e asiática descritas na Figura 3(31). A linhagem africana esteve limitada a circulação enzoótica entre primatas não-humanos e mosquitos *Aedes* silvestres, enquanto

que a linhagem asiática surgiu com capacidade de ser transmitida através de mosquitos do gênero *Aedes* adaptados e infectar os seres humanos(32).



FONTE: adaptado de Wang(31), 2016.

Figura 3. Representação das linhagens asiática e africana do ZIKV. A avaliação da sequência de nucleotídeos e aminoácidos através da ORF de isolados virais determinam as diferentes cepas identificadas com o nome, país de origem e ano de isolamento. Os círculos representam as espécies onde foram isolados. A escala inferior representa a distância genética por substituição de nucleotídeos e a direita da árvore, as duas linhagens representadas.

O *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) define a taxonomia do vírus e o classifica como pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, espécie *Zika virus*. Dentre os *Flavivirus*, cinquenta e três espécies são também agrupadas de acordo com o vetor transmissor em três grupos ou *clusters*: grupo 1-vírus transmitidos por carrapato; grupo 2-vírus transmitidos por mosquitos; grupo 3-vírus transmitido por vetor artrópode desconhecido. O zika

vírus está inserido no grupo 2, no clado X juntamente com o Spondweni vírus(SPOV)(33).

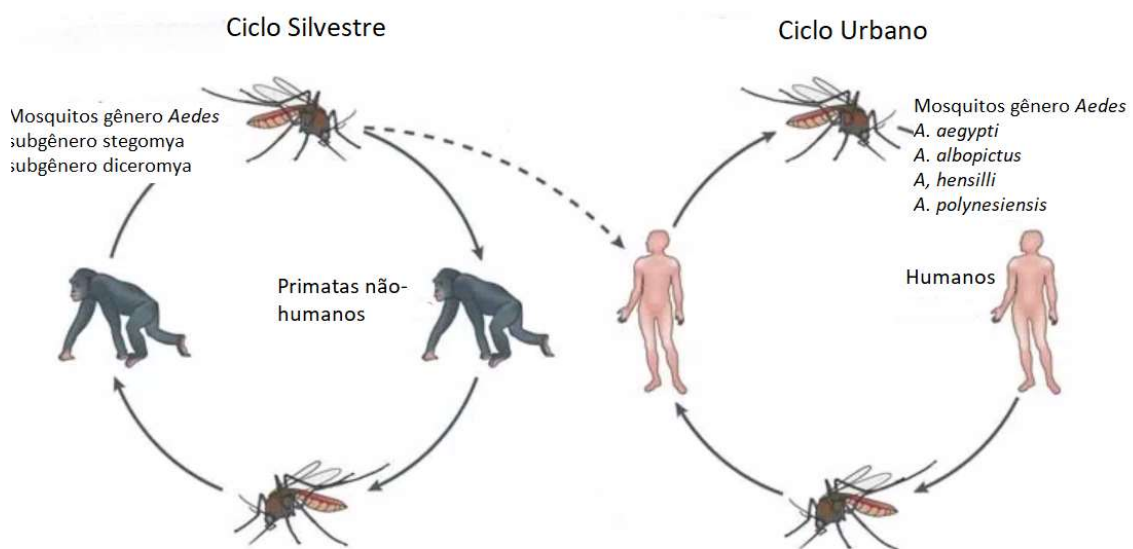
1.3 Formas de transmissão do zika vírus

A transmissão do ZIKV em humanos pode ocorrer de forma vetorial ou não-vetorial. A forma vetorial é a forma mais comumente descrita onde mosquitos infectados, geralmente do gênero *Aedes* depositam saliva contendo o vírus na superfície de pele e mucosas de hospedeiros susceptíveis durante a sua alimentação. Mosquitos da espécie *Aedes aegypti* são os mais implicados na transmissão horizontal por possuir alta capacidade vetorial, alimentar-se primariamente de sangue humano, realizando várias picadas em uma única refeição, viver em áreas próximas às habitações humanas e ser amplamente distribuído em áreas de florestas tropicais e subtropicais(34). O *Aedes albopictus* é outro vetor importante na transmissão, estando distribuído em áreas de clima temperado(35). Esta forma de transmissão vetorial é tida como causadora da disseminação do vírus nas epidemias.

A forma não-vetorial deve-se a transmissão passiva do vírus para a corrente sanguínea de hospedeiros susceptíveis através de uma fonte contaminada como ocorre com o sêmen durante o contato sexual(36-38), líquido amniótico durante o período perinatal(35, 39), transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos e enxertos(40).

A manutenção da circulação do vírus em seres humanos pode ser atribuída aos ciclos de vida: ciclo silvestre e ciclo urbano. No ciclo silvestre, o vírus circula

entre primatas não-humanos e mosquitos vetores do gênero *Aedes* principalmente do subgênero *stegomyia* e *diceromyia* que estão presentes em áreas de florestas, já no ciclo urbano a transmissão é de homem-vetor-homem, geralmente via mosquitos do gênero *Aedes* especialmente o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus* que estão presentes em áreas urbanas e em suas proximidades(Figura 4).



FONTE: adaptado de Whitehead Institute (disponível em: <https://wi.mit.edu>)

Figura 4. Ciclo de vida silvestre e urbano do zika vírus. No ciclo de vida silvestre, o vírus circula entre primatas não-humanos e mosquitos vetores encontrados em florestas. No ciclo urbano, a circulação acontece entre hospedeiros humanos infectados com o vírus, vetores do gênero *Aedes*, especialmente o *A. aegypti* e hospedeiros homens suscetíveis.

1.4 Manifestações clínicas da infecção pelo zika vírus

A infecção pelo ZIKV possui período de incubação de três a doze dias e é considerada leve, autolimitada com cerca de 70 a 80% dos indivíduos

infectados permanecendo assintomáticos. Quando presente, os sintomas duram até uma semana e incluem dores articulares, edema de extremidades, febre moderada (temperatura entre 37,8°C a 38,5°C), erupções cutâneas máculo-papulares pruriginosas, cefaleia, dor retro-orbital, conjuntivite não purulenta, vertigem, mialgia e desordem digestiva. Complicações graves com necessidade de internação e óbitos são raras, mas podem acontecer (41).

Entre 2013 e 2014, durante o surto deste vírus ocorrido na Polinésia Francesa e em um contexto de circulação dos três arbovírus - DENV, CHIKV e ZIKV, foram reportadas complicações neurológicas e autoimunes, como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB)(42). A SGB associada ao ZIKV acontece entre cinco a dez dias após a infecção e caracteriza-se clinicamente pelos mesmos sintomas da SGB causada por outras infecções que incluem a polineuropatia desmielinizante aguda, neuropatia motora axonal aguda e a síndrome de Miller-Fisher(10).

A complicação mais grave da infecção pelo ZIKV é a síndrome congênita do zika que foi descrita em outubro de 2015, quando médicos do Estado de Pernambuco relataram um aumento na incidência de crianças nascidas com microcefalia e observaram que muitas das gestantes com recém-nascidos afetados haviam apresentado sintomas compatíveis com o ZIKV durante a gravidez. A detecção do RNA viral no líquido amniótico e em tecidos de natimortos de mães afetadas levantou a possibilidade de uma relação causal com a microcefalia(43). Além da microcefalia, outros defeitos graves do sistema nervoso central de fetos e recém-nascidos como anormalidades oftalmológicas, cerebrais e disfunções dos sistemas piramidal e extra-piramidal fazem parte do

espectro da síndrome. A severidade destas manifestações desencadeou o comunicado da Organização Mundial de Saúde (OMS) em fevereiro de 2016, que declarava a doença como emergência mundial, com a recomendação que em países onde o ZIKV estivesse presente, mulheres em idade fértil evitassem engravidar (44).

1.5 Zika vírus e transfusão de sangue

O risco de transmissão transfusional(TT) havia sido descrito previamente para outras arboviroses como DENV, CHKV e WNV e pode ser justificado pela existência de períodos de viremia assintomática nos doadores de sangue associados a alta incidência de infecção em algumas regiões(45).O potencial risco de TT do ZIKV(TT-ZIKV) foi descrito pela primeira vez durante a epidemia da Polinésia Francesa, quando doadores assintomáticos foram testados através de metodologia de reação em cadeia de polimerase (PCR) *in house*¹ em mini-pools² de 3 amostras e apresentaram uma prevalência de 2,8% (42/1505) de viremia(46). Neste estudo também foi identificada uma taxa de doadores sintomáticos:assintomáticos de 1:3, demonstrando a ineficácia da triagem clínica em identificar os doadores potencialmente infectados.

Em estudos posteriores, a prevalência de viremia do ZIKV entre doadores de sangue variou de 1,84%(76/4.129) na Ilha de Martinica localizada na região do Caribe(47), 0,5% em Porto Rico(48) e 0,001%(49) a 0,004%(50) nos Estados

¹ Teste desenvolvido pelo laboratório, onde reagentes, calibradores e controles devem ser padronizados e validados antes do uso.

² As amostras são testadas em conjunto de acordo com a determinação do laboratório.

Unidos. No Brasil, o primeiro estudo realizado durante a epidemia do ZIKV em 2016 na região de Ribeirão Preto, interior do Estado de São Paulo, demonstrou prevalência de 2,7% em doadores de sangue(51).

Apesar disso, apenas dois casos de TT-ZIKV foram descritos na literatura até o momento(52, 53). Ambos os casos ocorreram no Brasil após a transfusão de concentrados de plaquetas. No primeiro caso, o doador de sangue total reportou ao serviço de hemoterapia sinais e sintomas de doença febril com cefaléia e indisposição 3 dias após a doação de sangue. Uma análise retrospectiva das amostras armazenadas na soroteca do Serviço excluiu o diagnóstico laboratorial de DENV, infecção com alta incidência na região, e revelou a positividade para ZIKV RNA através de metodologia molecular de RT-PCR. O processo de hemovigilância instituído rastreou os hemocomponentes oriundos da doação e revelou que os componentes eritrocitários e plasmáticos não haviam sido transfundidos e o componente plaquetário produzido foi destinado a um paciente submetido ao transplante hepático. O acompanhamento laboratorial deste receptor detectou a positividade do ZIKV RNA por RT-PCR, positividade por isolamento viral em cultura celular e DENV IgM negativo por metodologia de MAC-ELISA realizados 4 dias após a transfusão. O receptor não apresentou sinais ou sintomas de infecção pelo ZIKV. No segundo caso de TT-ZIKV, um doador de plaquetaférese³ entrou em contato com o serviço de hemoterapia 5 dias após a doação referindo que há 3 dias havia iniciado quadro de exantema, dor retro-orbital e dores articulares nos joelhos. A análise retrospectiva das amostras armazenadas na soroteca do Serviço excluiu

³ Método de doação de plaquetas automatizado, onde a separação do componente sanguíneos acontece no equipamento de aférese.

o diagnóstico laboratorial de DENV e CHKV e revelou a positividade para ZIKV RNA através de metodologia molecular de RT-PCR. O rastreio dos hemocomponentes oriundos da doação demonstrou que foram produzidas duas unidades de plaquetas por aférese e que foram destinados a dois pacientes. O primeiro paciente tratava-se de mulher de 54 anos portadora de mielofibrose primária e o segundo uma criança de 14 anos com leucemia mieloide aguda que havia sido submetida a um transplante de medula óssea .A avaliação laboratorial de amostras pré-transfusionais destes dois receptores excluiu DENV, CHKV e ZIKV por metodologia molecular, entretanto amostras coletadas 6 dias após a transfusão da paciente com mielofibrose e 23 e 51 dias após a transfusão da paciente com leucemia aguda foram positivas para ZIKV RNA por métodos moleculares. Nenhuma das duas pacientes apresentaram sintomas de infecção pelo ZIKV. Nos dois casos descritos acima, foi confirmada homologia entre as cepas dos doadores e receptores através da análise da sequência genômica e as análises filogenéticas revelaram que as sequências tinham uma relação próxima com a linhagem asiática.

Quando se analisa a repercussão clínica nos receptores de doações virêmicas não foram observadas manifestações pós-transfusão(52-54), tornando o curso clínico da TT pelo ZIKV ainda imprevisível e desconhecido.

1.6 Medidas de prevenção contra transmissão transfusional do zika vírus

A preocupação com o suprimento de sangue livre do ZIKV e lições aprendidas em outras epidemias de arboviroses como WNV(55) e CHKV(56)

exigiram ações proativas de órgãos internacionais, agências reguladoras e indústria de vários países durante os surtos da infecção pelo mundo.

Medidas disponíveis para garantir a segurança do sangue livre do ZIKV incluem a triagem clínica realizada para seleção do doador com questões voltadas para sinais e sintomas da infecção, obtenção de informação pós-doação (IPD), manutenção dos hemocomponentes em quarentena durante o período de incubação da infecção; uso da tecnologia de inativação de patógenos(57) e testagem molecular do ZIKV em doadores de sangue(54).

Na Polinésia Francesa, medidas específicas para o ZIKV foram instituídas durante a epidemia de 2013-2014 como a aplicação de questionário médico e realização de exame físico pré-doação além da obtenção do histórico de viagens às regiões em surtos e orientações sobre importância da informação pós-doação (IPD). A IPD considerada uma medida auxiliar de segurança, consiste no reporte de sinais e sintomas de infecção do ZIKV após um período de cinco a quatorze dias da doação que permite o descarte de produtos em estoque supostamente contaminados e o processo de retrovigilância. Entretanto, estas medidas não permitem diagnosticar aproximadamente 80% dos doadores virêmicos devido à alta proporção de doadores assintomáticos(46) e, portanto, cuidados adicionais foram utilizados na tentativa de controle da TT-ZIKV como manutenção dos concentrados de hemácias em quarentena por período de sete dias antes da liberação para transfusão, inativação de patógenos para componentes plaquetários, importação de plasma de regiões não afetadas e testagem dos ácidos nucleicos (NAT, do inglês *Nucleic Acid Test*) em amostras de doadores de sangue(54).

Com o avanço da infecção em países da América Latina, regiões do Caribe e notificações de casos autóctones no território americano de Porto Rico, a agência reguladora Americana, *Food and Drug Administration*(FDA) publicou em fevereiro de 2016 um guia com recomendações, visando a proteção do estoque de sangue no seu território. Para áreas consideradas de transmissão ativa para ZIKV, o sangue total e hemocomponentes deveriam ser obtidos de áreas sem transmissão ou se coletados na área, deveriam ser testadas para ZIKV RNA, apesar de testes de NAT comerciais ainda não estarem disponíveis na ocasião. Componentes plasmáticos e plaquetários deveriam ser tratados com tecnologia de inativação de patógenos aprovadas. Em áreas sem transmissão ativa, foi recomendada a recusa dos doadores por quatro semanas quando houvesse histórico de viagem para áreas com epidemia ou contato sexual com homens que foram diagnosticados com ZIKV ou estiveram em áreas de transmissão ativa(58).

Em março de 2016, o FDA aprovou o uso do teste de triagem ZIKV RNA, *Cobas® Zika test* (Roche Molecular System) e em agosto do mesmo ano, após a detecção de doações autóctones ZIKV RNA positivas nos Estados Unidos, o guia foi revisado com orientação de testagem imediata para ZIKV com NAT-individual (NAT-ID)(59). Nos demais estados foi permitida a implantação em até doze semanas. Em dezembro de 2016 todo o território americano já havia implementado a testagem do NAT-ID para ZIKV em todas as doações de sangue. Com a redução dos casos notificados em julho de 2018 esta estratégia foi revisada e as amostras passaram a ser testadas em mini-pools de 6 amostras(60)

No Brasil, a recomendação oficial foi realizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Ministério da Saúde através de uma nota técnica conjunta publicada em agosto de 2016(61) e atualizada em fevereiro de 2020(62) que define que candidatos à doação diagnosticados clinicamente ou laboratorialmente pelo vírus da zika devem ser considerados inaptos para doação por cento e vinte dias após a recuperação completa e candidatos que tiveram relação sexual com pessoas - sexo masculino ou feminino, que apresentaram diagnóstico clínico ou laboratorial de febre pelo zika nos últimos noventa dias devem ser considerados inaptos para doação por trinta dias após o contato sexual. Nessas notas técnicas está incluída a orientação sobre a informação pós-doação.

A inativação de patógenos com amotosalen e luz ultravioleta A (UVA) foi aprovada pela ANVISA em setembro de 2015 e até o momento não há testes comerciais aprovados no Brasil para triagem de doadores de sangue para o ZIKV.

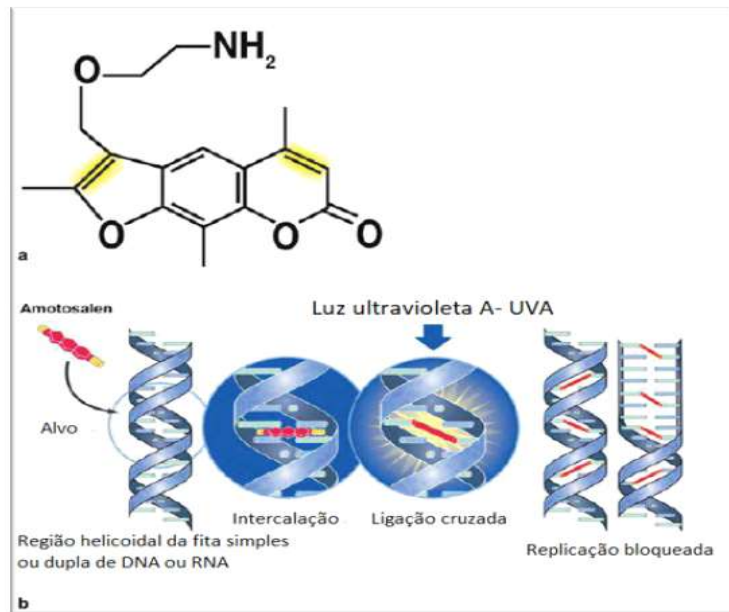
1.6.1 Tecnologia de inativação de patógenos

A tecnologia de inativação de patógenos (IP) consiste em estratégia bem estabelecida na indústria de fracionamento de plasma ao longo de pelo menos trinta anos com resultados satisfatórios. Entretanto, os tratamentos utilizados com solvente-detergente e azul de metileno não demonstraram eficácia semelhante quando aplicados aos hemocomponentes(63).

O surgimento de uma nova geração de técnicas de IP permitiu o tratamento de concentrados de plaquetas e plasma, através do uso de agentes alquilantes sozinhos ou em combinação com iluminação ultravioleta que atuam bloqueando de forma irreversível a replicação do ácido dextrorribonucléico(DNA) ou RNA de vários agentes infecciosos como bactérias, fungos, protozoários e vírus, incluindo os agentes emergentes como ZIKV e DENV.

Sua grande utilidade surge quando testes diagnósticos ainda não estão disponíveis especialmente, em situações de surtos de agentes emergentes e para auxiliar na redução do risco residual de infecções durante o período de “janela sorológica” de agentes já testados(64). Apesar destas vantagens, a IP não é eficaz para príons e ainda não está disponível no mercado para aplicação em concentrados de hemácias de forma rotineira.

Estão disponíveis comercialmente as tecnologias como o INTERCEPT (Cerus Corporation), Mirasol (Terumo BCT) e o THERAFLEX UV (Macopharma), e apenas o primeiro é aprovado para uso no Brasil. No INTERCEPT um agente fotoquímico sintético psoraleno chamado de amotosalen associado à luz ultravioleta A(UVA) se liga às bases nitrogenadas pirimidínicas da fita de DNA ou RNA de forma covalente (65) como mostrado na Figura 5.



FONTE: adaptado de Johannes Irsch(65), 2011.

Figura 5. Estrutura química do amotosalen e mecanismo de ação. a: estrutura química do amotosalen, b: mecanismo de ação. O agente químico amotosalen se liga às bases nitrogenadas do DNA de forma covalente, em uma reação irreversível o que impede a replicação do material genético.

A ligação covalente é inespecífica o que permite que esta tecnologia possa ser utilizada para um amplo espectro de patógenos e sua eficácia já foi comprovada para arbovírus como DENV(66), CHKV(67) e ZIKV (68).

No sistema Mirasol, o agente alquilante é a riboflavina (vitamina B2) submetida à luz ultravioleta A ou B. Esta associação bloqueia a replicação de DNA ou RNA e a riboflavina sendo de ocorrência natural seus produtos decorrentes da fotodegradação são não-tóxicos e não-mutagênicos (69). O THERAFLEX UV (Macopharma) utiliza a luz ultravioleta C que interage com as bases pirimidínicas, bloqueando a transcrição dos ácidos nucleicos(70). A Tabela 1 demonstra as características das três tecnologias de inativação de patógenos disponíveis.

Tabela 1. Características das principais tecnologias de inativação de patógenos disponíveis em 2020

Tecnologias de inativação de patógenos			
	INTERCEPT	Mirasol	THERAFLEX UV
Mecanismo de ação	Amotosalen + UVA	Riboflavina + UV	UVC sozinho
Hemocomponentes	Plasma e plaquetas	Plasma e plaquetas e em desenvolvimento para sangue total	Plasma e plaquetas e em desenvolvimento para hemácias
Status	Aprovado no Brasil*	Aprovado em alguns países da Europa	Em desenvolvimento clínico*

* Dados atualizados até novembro de 2020.

1.6.2 Testes laboratoriais para detecção do zika vírus

Testes laboratoriais diagnósticos para o ZIKV são amplamente utilizados em áreas de transmissão ativa do vírus para o diagnóstico de pacientes sintomáticos, gestantes, triagem de doadores de sangue e para estudos de soroprevalência(71), além da detecção em casos importados nas áreas não-endêmicas(25, 72).

O diagnóstico da infecção pelo ZIVK pode ser feito através da detecção direta do RNA viral ou indireta, ou seja, pela detecção de anticorpos. A detecção direta do RNA do vírus através de técnicas moleculares é possível até no máximo 1 semana após o início dos sintomas, já os anticorpos específicos são detectados por longos períodos e podem indicar infecções recentes e pregressas.

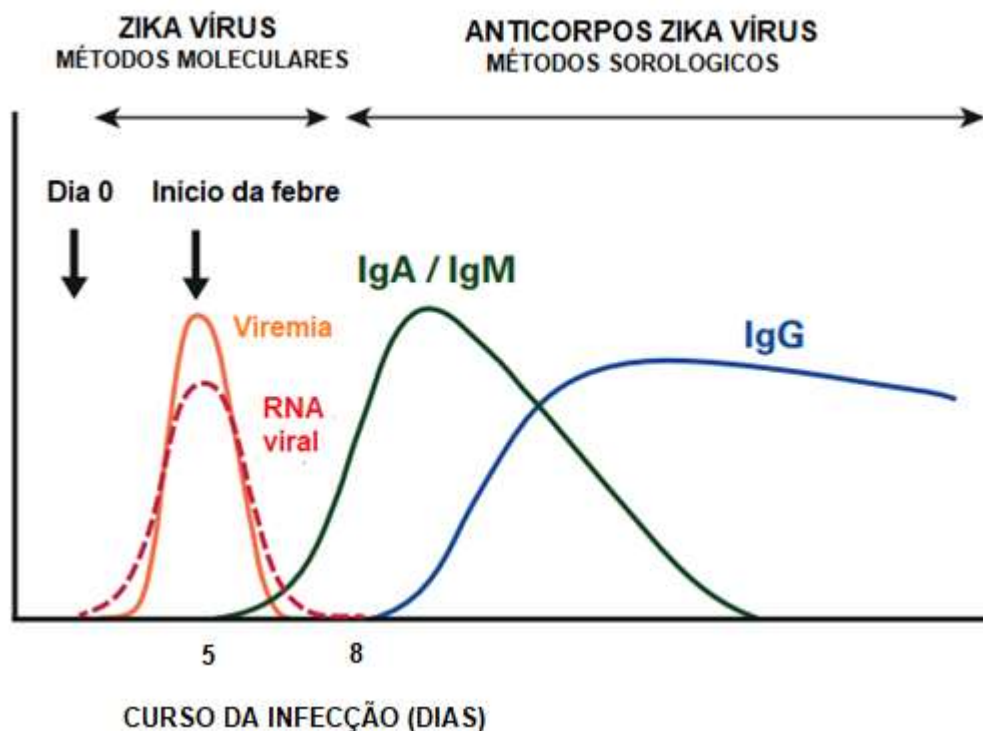
1.6.2.1 Métodos sorológicos

Os métodos sorológicos disponíveis para o ZIKV são utilizados para o diagnóstico de infecções recentes em pacientes sintomáticos, especialmente gestantes e recém-nascidos, na avaliação de soroprevalência de populações sob risco e como método complementar na avaliação dos doadores de sangue. Os testes mais amplamente utilizados de rotina para diagnóstico são os testes para detecção do anticorpo IgM, o teste para detecção de anticorpos IgG e o ensaio de neutralização por redução de placa (PRNT do inglês *Plaque Reduction Neutralization Test*).

O ZIKV IgM usualmente aparece 5 dias após início dos sintomas e pode persistir por mais de 12 semanas, ou seja, a presença deste marcador indica somente que uma infecção recente ocorreu nos últimos 2-3 meses e que portanto, estes testes não devem ser usados isoladamente como testes confirmatórios, principalmente em países endêmicos. Está disponível comercialmente na metodologia de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) de alta sensibilidade ou por Imunofluorescência Indireta (IIFIT do inglês, *Indirect Immunofluorescence*).

O ZIKV IgG é o marcador de infecção pregressa, está presente após logo após o aparecimento do ZIKV IgM e pode persistir por anos ou por toda a vida do indivíduo. Assim como para detecção do ZIKV IgM, as metodologias mais utilizadas para detecção do ZIKV IgG são imunofluorescência indireta e ELISA.

O curso clínico da infecção pelo ZIKV e surgimento dos principais marcadores sorológicos: IgM e IgG estão demonstrados na Figura 6.



FONTE: Adaptado de Euroimmun website (disponível em: <https://www.euroimmun.com.br/products/doencastropicais/conteudo>)

Figura 6. Curso da infecção pelo zika vírus e o aparecimento dos principais marcadores sorológicos.

O diagnóstico confirmatório requer técnicas específicas como o teste PRNT, considerado o padrão-ouro para o diagnóstico de exposição ao ZIKV, pois permite a detecção e quantificação de anticorpos neutralizantes e a diferenciação com anticorpos de outros flavivírus tanto nas infecções primárias como secundárias(41, 73, 74). Este teste é mais sensível e específico que outros métodos sorológicos, entretanto tem como desvantagens o longo tempo de execução e deve ser realizado em laboratório experiente e possuidor de

autorização para o manuseio de vírus vivos, o que dificulta seu uso de forma rotineira.

Sabidamente, os métodos sorológicos apresentam uma limitação decorrente da ocorrência de reação cruzada com anticorpos dirigidos a outros flavivírus, inclusive em alguns casos causando alta reatividade descrito como fenômeno “antigênico *original sin*”(75) o que compromete seu uso, especialmente em regiões onde há circulação de outros flavivírus.

Portanto, diante destas dificuldades, o uso de metodologias sorológicas para prevenção de TT pelo ZIKV não são amplamente utilizadas.

1.6.2.2 Métodos moleculares

Os métodos moleculares têm por objetivo a detecção do genoma viral e são, sem dúvida, uma boa opção de diagnóstico de infecção pelo ZIKV devido a sua especificidade, rapidez e reprodutibilidade. As principais técnicas utilizadas são baseadas no método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) que consistem na amplificação do material genético viral *in vitro* em amostras de soro, plasma, tecido ou urina.

A técnica mais utilizada é a de RT-PCR (RT-PCR) para detecção do ZIKV que exige a transcrição do RNA viral através da transcriptase reversa para fita simples de DNA complementar(cDNA), seguida da conversão do cDNA em DNA de fita dupla, podendo ser realizada em uma única etapa (*one-step*) ou duas etapas, associado a inicializadores específicos para diferentes regiões gênicas do vírus e sondas fluorescentes. Técnicas utilizando inicializadores para regiões

conservadas do genoma dos flavivírus foram descritas, porém demonstraram falhas na detecção do ZIKV em pacientes infectados(76) e necessitam de testes adicionais para detecção da espécie envolvida.

É sabido que as sequências de inicializadores específicos para o ZIKV utilizados na reação de PCR não têm total cobertura para diversidade das cepas descritas e falsos negativos podem ocorrer. A Figura 7 demonstra os inicializadores e sondas descritos e utilizados para detecção do ZIKV através de PCR em tempo real e a Figura 8 contém o resumo dos principais PCRs e tipos de amostras usadas para detectar o RNA viral nos casos humanos.

Alvos do RT-PCR e inicializadores	Sequências	Produto do Gene	Produto	Tamanho do Amplicon(bp)
ZIKV				
ZIKV835	TTGGTCATGATACTGCTGATTGC	M/E *	835-857	76
ZIKV911c	CCTTCGACAAAAGTCCCTATTGC		911-890	
ZIKV860FAM	CGGCATACAGCATCAGGTGCATAGGAG		860-886	
ZIKV1086	COGCTGCCAACACAAG	pE **	1086-1102	76
ZIKV1162c	CCACTAAAGTCTCTTTGCGAGACAT		1162-1159	
ZIKV1107FAM	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA		1107-1137	
ZIKVENVF	GCTGGDGCRGACACHGGRACCT	E ***	1538-1558	364
ZIKVENVR	RTCYACYGCCATYTGGRCTG		1902-1883	
ZIKVP9027a	CCTTGGATTCTTGAACGAGGA	NS5 ****	9121-9141	192
ZIKVR9197ca	AGAGCITTCATTCTCGAGATCAA		9312-9290	
Direto	AARTACACATACCARAACAAAAGTGGT	NS5	9271-9297	102
Reverso	TCCRCTCCCYCTYTGCTCTTG		9352-9373	
Sonda FAM	CTYAGACCAGCTGAAR		9304-9320	

FONTE: adaptado de Musso(41), 2016.

Figura 7. Inicializadores e sondas descritos na literatura e utilizados para detecção do ZIKV através de PCR em tempo real.

*M/E – junção Membrana/Envelope.

**p/E -envelope parcial.

***E – envelope.

****NS5- proteína não-estrutural 5.

Autor (ano da publicação)	Alvo da PCR	Técnica da PCR	Tamanho Amplicon (pb)	Linhagem do ZIKV analisada	Área da linhagem do ZIKV	Número de pacientes testados em estudos	Tipos de amostras testadas
Lanciotti et al. (2008)	Zika virus prM/E, target 1	Hydrolysis probe	76	Asian, African	Asian	> 200 (combined set)	Serum, urine, amniotic fluid
Lanciotti et al. (2008)	Zika virus E, target 2	Hydrolysis probe	76	Asian, African	Asian	> 200 (combined set)	Serum, urine, amniotic fluid
Faye et al. (2013)	Zika virus NS5	Locked nucleic acid probe	102	Asian, African	African	3 (B Rockx, personal communication, February 2016)	Serum
Tappe et al. (2014)	Zika virus NS3	Hydrolysis probe	94	Asian	Asian	5	Serum
Faye et al. (2008)	Zika virus E	Conventional	364	African	Asian	> 15 (combined set)	Serum
Pyke et al. (2014)	Zika virus NS1	Hydrolysis probe	65	Asian	Asian	1	Serum
Pyke et al. (2014)	Zika virus E	Hydrolysis probe	71	Asian	Asian	1	Serum
Moureaux et al. (2007)	Flavivirus NS5	SYBR®-green-based	269–272	African	Asian	2	Serum, urine
Kuno et al. (1998)	Flavivirus NS5	Conventional	1079	Asian, African	Asian	51	Serum
Scaramozzino et al. (2001)	Flavivirus NS5	Conventional (semi-nested)	220	African	Asian	1 (L. Barzon, personal communication, February 2016)	Serum, urine
Maher-Sturgess et al. (2008)	Flavivirus NS5	Conventional	800	African	Asian	1	Serum
Ayers et al. (2006)	Flavivirus NS5	Conventional	863	–	Asian	1	Serum, urine, nasopharynx

FONTE: adaptado de Charrel RN(72), 2016.

Figura 8. Resumo dos principais PCRs descritos e tipos de amostras usadas para detectar o ZIKV RNA em casos humanos.

Protocolos utilizando a técnica de PCR em tempo real *in house* para detecção do ZIKV foram utilizados em alguns países como método de prevenção para TT nas epidemias da Polinésia Francesa (46) e na Martinica(47), já que não havia técnicas comerciais disponíveis. Durante a epidemia de Porto Rico em 2016, as amostras de doadores de sangue foram testadas com NAT individual, utilizando uma técnica recém desenvolvida e autorizada pelo FDA como aplicação de nova metodologia investigacional na ocasião pela empresa *Roche* denominada *de Cobas® Molecular System*. Outra metodologia investigacional testada nos EUA continental em 2016 foi o NAT da empresa Grifols, o *Procleix® Zika Assay*.

O aumento da sensibilidade dos testes de NAT em amostras individuais quando comparados às testadas em minipools de seis amostras já foi demonstrado em estudos anteriores durante a epidemias do Vírus do Nilo nos

EUA(77) e comprovado em estudos de prevalência do ZIKV em regiões americanas no ano de 2016 onde 50% das amostras positivas não foram detectados em diluições de 1:6, simulando testes em minipools(50).

Outra técnica molecular disponível é a amplificação mediada por transcrição (TMA, do inglês *Transcription-Mediated Amplification*) que utiliza um sistema de duas enzimas para conduzir a reação: RNA polimerase e transcriptase reversa (RT). É uma reação isotérmica, a qual é realizada em um único tubo, com temperatura constante e amplifica RNA ou DNA. Este método é utilizado na rotina de doadores com resultados semelhantes a metodologia de RT-PCR(78).

A implementação de testes moleculares de rotina implica na necessidade de uma validação laboratorial interna, padronização de técnica, constante suprimento de reagentes, licença pelas agências regulatórias ou elaboração de projetos de pesquisa, além do custo elevado.

Em outubro de 2017, o FDA aprovou o primeiro teste para triagem do zika vírus na plataforma Cobas© da empresa *Roche* para doadores de sangue, mas até o momento não há testes laboratoriais aprovados no Brasil para a triagem de doadores de sangue.

2 JUSTIFICATIVA

O rápido avanço da epidemia do ZIKV no Brasil no ano de 2016 e a ausência de métodos de inativação de patógenos e testes comerciais disponíveis e aprovados pela ANVISA para doadores de sangue geraram uma busca por alternativas para garantir a segurança transfusional dos receptores de hemocomponentes atendidos pelo Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE).

O estudo foi conduzido no HIAE localizado no bairro do Morumbi, região Oeste do município de São Paulo. A unidade hospitalar de alta complexidade dispõe dos setores de pronto atendimento adulto e pediátrico, unidades de internação clínica e cirúrgica, maternidade, unidades de terapias intensivas (UTI) adulto, pediátrica e neonatal, centro oncológico, unidade de transplante de medula óssea (TMO) e o Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular (DHTC) responsável pela coleta, processamento, testagem, armazenamento e transfusão dos hemocomponentes que são utilizados na própria unidade do Morumbi, Hospital Municipal Vila Santa Catarina e unidades externas da Sociedade Brasileira Israelita Albert Einstein.

O DHTC realiza mensalmente, em média, coleta de 1.100 bolsas de sangue e transfunde 950 unidades dentre os quais 63,1% são concentrados de hemácias, 28,4% são concentrados de plaquetas, 8% de plasma fresco congelado e 0,5% de crioprecipitado, especialmente na UTI e nas clínicas de onco-hematologia, incluindo o TMO.

A preocupação com a qualidade no atendimento aos seus pacientes além da importância em contribuir cientificamente com a geração de dados para o conhecimento do risco de TT do ZIKV na cidade de São Paulo possibilitou uma resposta rápida na aprovação do projeto de pesquisa que deu origem a este estudo.

3 OBJETIVOS

Avaliar a prevalência de viremia pelo zika vírus em doadores de sangue do Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE) no período de maio de 2016 a maio de 2018.

3.1 Objetivo secundário

- Desenvolver e validar metodologia de RT-PCR em tempo real para detecção do RNA do zika vírus em amostras de plasmas de doadores de sangue do HIAE.
- Estimar a soroprevalência do ZIKV IgG por amostragem dos doadores de sangue do HIAE.
- Realizar metodologias sorológicas complementares ao ZIKV IgG, considerando a possibilidade de reação cruzada entre o ZIKV e outros flavivírus.

4. MÉTODOS

Este é um estudo transversal prospectivo onde todos os candidatos que compareceram para doação de sangue no HIAE durante o período do estudo realizaram uma etapa de triagem clínica conduzida por profissionais de saúde de nível superior em ambiente privativo que incluiu o questionamento sobre hábitos de vida, antecedentes pessoais patológicos e familiares e história de viagens recentes, conforme regulamentação das Portaria do Ministério da Saúde do Brasil nº158 de 2016(79) e Portaria de Consolidação nº5 de 2017(80)(Anexo A). Candidatos com histórico de diagnóstico de zika nos últimos trinta dias, contato sexual com pessoas do gênero masculino ou feminino que tiveram diagnóstico clínico ou laboratorial de zika nos últimos noventa dias, foram considerados inaptos para doação de sangue por trinta dias após a recuperação clínica completa ou após o contato sexual, respectivamente, conforme Nota Técnica Conjunta 2016(61). Histórico de viagem para regiões com alta incidência de infecção pelo zika vírus tornou o doador inapto por um período de trinta dias. Foram consideradas áreas endêmicas no Brasil as regiões com incidência acumulativa acima de 100 casos/100.000 habitantes nos últimos doze meses da realização da triagem clínica e publicadas no Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde e divulgado no *website* da Anvisa(81-83). Para regiões fora do Brasil, a fonte da pesquisa foi o site do *Centers for Disease Control and Prevention*(CDC). As consultas sobre áreas endêmicas foram feitas semanalmente e aqueles candidatos à doação de

sangue aptos na triagem clínica assinaram o termo de consentimento para doação de sangue e hemocomponentes (Anexo B).

4.1 Critérios de inclusão do estudo

Todos os candidatos aptos na triagem clínica que compareceram para doação no HIAE às segundas, terças, quartas e quintas-feiras no período de 23 maio de 2016 a 31 de maio de 2018 foram convidados a participar do estudo. No total 3.221 doadores de sangue foram incluídos no estudo e foram submetidos a aplicação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido específico (Anexo C).

4.2 Considerações éticas

Baseado na regulamentação da Portaria de Consolidação do Ministério da Saúde do Brasil nº5 de 2017(80) está estabelecido o direito de confidencialidade da identidade dos doadores de sangue, sendo os mesmos identificados através do número de doação assegurando-lhes o anonimato.

Como trata-se de um estudo transversal com pesquisa em seres humanos foi necessária aprovação do estudo pelo comitê de ética do Hospital Israelita Albert Einstein (CAAE: 62612716.3.0000.0071) (Anexo D).

4.3 Extração do RNA do zika vírus

Os 3.221 doadores de sangue participantes do estudo foram submetidos a coleta de cinco mililitros de sangue em tubo BD Vacutainer PPT (Franklin

Lakes, USA) e identificados com número único de doação no padrão da *International Society of Blood Transfusion*(ISBT) destinada ao serviço do HIAE, garantindo o sigilo da identidade do doador. O plasma foi separado em centrífuga Sorvall (ThermoFisher Scientific) na velocidade de centrifugação de 4.000 rpm por dez minutos e submetido aos testes individualmente.

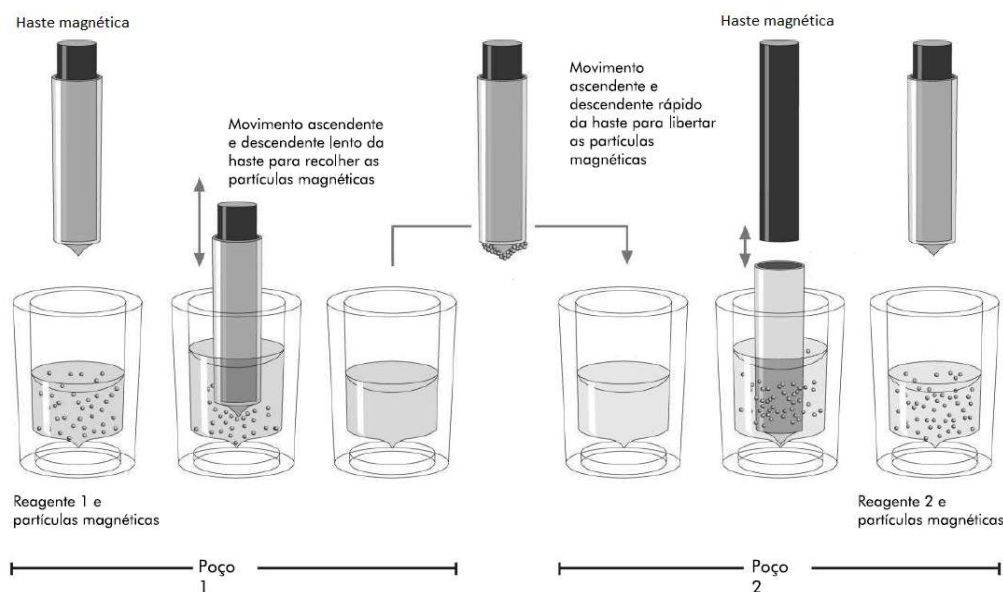
O RNA viral foi extraído no equipamento QIA Symphony (Qiagen), utilizando-se o kit *DSP Virus/Pathogen MidiKit*, seguindo o protocolo CELLFREE1000_V7_DSP, conforme instruções do fabricante. Neste protocolo são necessários 1.000µL de amostra de plasma, visando aumentar a sensibilidade do teste.

Adicionamos em todas as amostras a serem testadas um controle interno da extração composto por póliovírus (PV) vacinal Sabin na diluição de 1/100 em água purificada.

O controle positivo da reação é um sobrenadante de cultura de ZIKV da linhagem asiática derivado de plasma positivo de doador que foi cultivado em células VERO no laboratório de virologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT) e gentilmente cedida pelo orientador para esta finalidade. A concentração final deste controle é de 1/100.000. Os controles negativos são amostras de plasmas de doadores previamente testadas, conforme regulamentação da legislação brasileira em vigor e para o ZIKV com resultados negativos.

O princípio de extração é baseado na purificação dos ácidos nucléicos através da ligação às partículas magnéticas de sílica (Figura 8). Uma haste magnética protegida por uma cobertura entra no poço contendo a amostra, reagentes, os ácidos nucléicos ligados às partículas de sílica e atrai estas partículas magnéticas. Através de vários movimentos horizontais ascendentes e

descendentes de baixa velocidade, a haste recolhe todas das partículas de sílica ligadas aos ácidos nucleicos presentes da amostra. Em seguida, a cobertura da haste magnética é posicionada sobre outro poço e as partículas magnéticas são liberadas. Esses passos são repetidos várias vezes durante o processamento até a obtenção do eluido final contendo o RNA purificado.



FONTE: adaptado de Qiagen *website* (disponível em: <https://www.qiagen.com/br/products/diagnostics-and-clinical-research/sample-processing/qiasymphony-dsp-viruspathogen-kits>)

Figura 9. Esquema do princípio de extração do RNA viral do equipamento QIASymphony (Qiagen).

O aparelho QIASymphony(Qiagen) faz a extração simultânea de até 96 amostras por rodada. A cada rodada onde foram extraídas o RNA das amostras, foram extraídos também o controle negativo e o controle positivo importantes para a validação da extração.

O RNA viral foi extraído no dia seguinte a coleta e até o momento da extração os tubos originais foram mantidos na temperatura entre 2 e 10 °C.

4.4 RT-PCR em tempo real para detecção do RNA do zika vírus

A RT-qPCR é realizada com o sistema *QuantiNova Probe RT-PCR kit*(Qiagen) em passo único, com par de inicializadores senso e anti-senso e uma sonda específicos para o zika vírus dirigidos ao gene do complexo pré-membrana (prM)/envelope descritos previamente na literatura(75) e um par de inicializadores senso e anti-senso e uma sonda para o póliovírus em uma reação duplex. Os pares de inicializadores e sondas foram sintetizados na *Integrated DNA Technologies* (IDT) e estão descritos nas Tabelas 2 e 3.

Para o ZIKV, a sonda contém o 56FAM como fluóroforo e para o póliovírus

Funções na reação de PCR	Posição genômica	Sequência (5' -> 3')
ZIKV 1107FAM (Sonda)	ZIKV 1107 - 1137	/56-FAM/AGCCTACCT/ZEN/TGACAAGCAGTCAGACCACTCAA/3IABkFQ/-
ZIKV 1086 (Inicializador senso)	ZIKV 1086-1102	CCGCTGCCCAACACAAG
ZIKV 1162c(Inicializador anti-senso)	ZIKV 1162-1139	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT

o 5HEX, que serão lidos nos canais verde e amarelo, respectivamente.

Tabela 2. Sonda e par de inicializadores senso e anti-senso utilizados no PCR em tempo real para o zika vírus

FONTE: adaptado de Lanciotti (75), 2008.

Funcões na reação de PCR	Sequência (5' -> 3')
Sonda	/5HEX/CGTTGGCTT/ZEN/GACTCATTTT/3IABkFQ
Inicializador senso	GCTTTATTGCTCCCAGAGTACTCA
Inicializador anti-senso	CAATTCGACTGAGGTAGGGTACT

Tabela 3. Sonda e par de inicializadores senso e anti-senso utilizados no PCR em tempo real para o póliovírus

FONTE: Anna Nishiya, PhD, Departamento de biologia molecular, Fundação Pró-Sangue, comunicação pessoal

A preparação da RT-PCR é realizada no pipetador automático QIAgility(Qiagen) seguindo o protocolo: 1x Quantinova Probe RT-PCR MasterMix(Qiagen), inicializadores do ZIKV e do póliovírus nas concentrações de 0,5µM, sondas do ZIKV e do póliovírus nas concentrações de 0,25µM e 8,8µL de RNA para um volume final de 20 µL(Tabela 4).

Tabela 4. Preparação da PCR com volumes e concentrações de reagentes utilizados por amostra

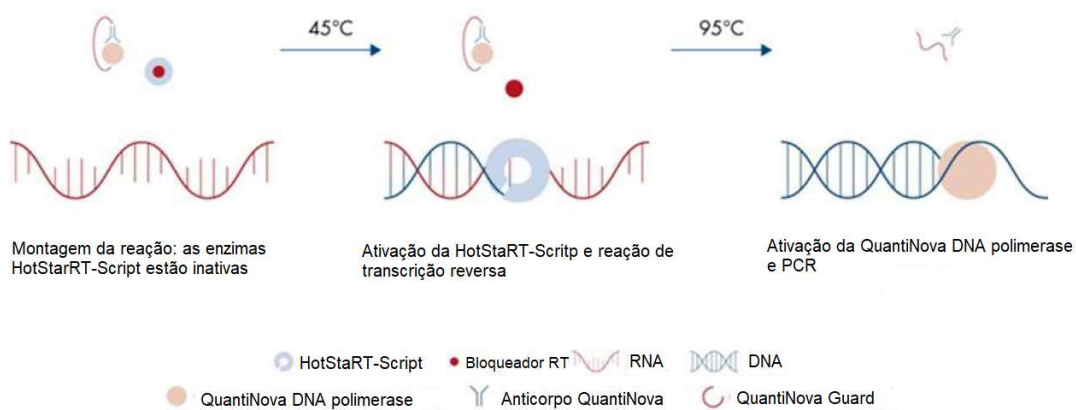
Utilizamos ainda dois controles da reação: H₂O purificada e um amostra *wipe* que servem como controle de contaminação da reação e do ambiente, respectivamente. A amostra *wipe* foi obtida através do esfregação de três superfícies diferentes da sala de onde realiza-se a extração.

A ciclagem é realizada no termociclador RotorGene 5Plex HRM (Qiagen) com um protocolo estabelecido no *QuantiNova Probe RT-PCR Kit* de 45⁰C por 10 minutos, 95⁰C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95⁰C por cinco segundos e 60⁰C por 30 segundos.

O princípio da amplificação do *QuantiNova Probe RT-PCR kit* ocorre da seguinte forma: em temperatura ambiente a enzima *HotStart RT-Script* é inibida pelo bloqueador da transcriptase reversa (RT) e a *QuantiNova* DNA polimerase permanece inativa pelos anticorpos *QuantiNova* e *QuantiNova Guard*. A 45⁰C, a transcriptase reversa (RT) é ativada enquanto a *QuantiNova* DNA polimerase permanece inativa. A 95⁰C, a RT é desnaturada e a *QuantiNova* polimerase é

Reagente	Volume (μ L)	Concentração (μ M)
QuantiNova Probe RT-PCR Master Mix	10	1x
Inicializadores ZIKV	0,5	0,5
Inicializadores PV	0,5	0,5
QuantiNova RT Mix	0,2	0,25
Total	11.2	-
RNA	8,8	-
Volume final	20	-

ativada. (Figura10).



FONTE: adaptado de Qiagen website (disponível em: <https://www.qiagen.com/br/products/QuantiNovaProbeRT-PCRKit>)

Figura 10. Princípio da amplificação do *QuantiNova Probe RT-PCR kit*.

As análises das curvas de amplificação são realizadas no software do equipamento com definição do *threshold* entre 0,070 até 1,000 para a corrida do zika e 0,040 para a do PV. As amostras que apresentarem amplificação acima do *threshold* são consideradas positivas.

4.4.1 Análise do limite de sensibilidade do RT-qPCR para detecção do RNA

ZIKV

O limite de sensibilidade do teste foi determinado através do cálculo da *Probit Analysis*, utilizando o *software* estatístico, IBM Corp. SPSS versão 2.0 com intervalo de confiança de 95%.

Para este cálculo, utilizamos amostra padrão contendo $7,5 \log_{10}$ cópias/ml do ZIKV fornecida pela Organização Mundial da Saúde e o Paul Ehrlich Institut. As amostras padrão foram diluídas em plasma de doadores ZIKV RNA negativo para obtenção de concentrações finais de 500UI/mL, 250UI/mL, 100UI/mL, 50UI/mL, 5UI/mL e 0,5UI/mL. Para cada concentração foram realizadas quatro extrações e seis amplificações totalizando vinte e quatro réplicas para cada concentração. Os resultados estão demonstrados na Tabela 5. O limite de sensibilidade calculado foi de 153UI/mL (limite de detecção, 95%).

Tabela 5. Resultados obtidos para o cálculo de limite de sensibilidade do teste através de *Probit Analysis*

CONCENTRAÇÃO	Ct	CONCENTRAÇÃO	Ct	CONCENTRAÇÃO	Ct	CONCENTRAÇÃO	Ct	CONCENTRAÇÃO	Ct
500 UI/mL		250 UI/mL		100 UI/mL		50 UI/mL		5 UI/mL	
01/02/2017	33,04 31,89 32,9 34,55 32,05 32,79 31,34 32,49	09/02/2017	32,5 34,12 34,65 32,86 32,98 33,47 32,79 32,05	09/02/2017	34,78 34,24 33,11 32,50 34,39 35,46 34,63 35,34	01/02/2017	33,61 UND 34,93 34,91 35,14 34,67 UND UND	01/02/2017	34,39 35,4
02/02/2017	32,72 32,23 31,91 33,5	10/02/2017	33,84 32,68 34,22 33,54	10/02/2017	36,04 33,24 UND	02/02/2017	35,15 UND UND 35,51 UND	02/02/2017	35,45 34,93
03/02/2017	33,77 34,99 32,33 35,62 34,74 32,8	15/02/2017	36 37,81 37,99 36,8 36,33 36,68	15/02/2017	38,32 UND 37,58 38,09 UND 36,81	03/02/2017	36,97 UND UND 36,33 UND UND	03/02/2017	
06/02/2017	39,73 35,45 35,71 35,4 35,56 34,77	16/02/2017	35,64 38,13 36,62 36,57 36,06 35,88	16/02/2017	37,46 UND 38,61 UND	06/02/2017	UND 35,75 UND UND UND UND	06/02/2017	
média	33,85	média	35,01	média	36,36	média	35,25	média	35,19
DP	1,88	DP	1,91	DP	1,73	DP	0,97	DP	0,37
hit rate	24/24	hit rate	24/24	hit rate	17/24	hit rate	9/24	hit rate	2/24
hit rate %	100%	hit rate %	38%	hit rate %	38%	hit rate %	38%	hit rate %	8,3%

4.4.2 Análise da especificidade do RT-qPCR para detecção do RNA do ZIKV

A especificidade do teste foi determinada através da análise qualitativa de amostras padrão fornecida pela Organização Mundial da Saúde e o Paul Ehrlich Institut contendo os quatro diferentes sorotipos do DENV: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4.

4.5 Participação em teste de proficiência externo de diagnóstico molecular do zika vírus

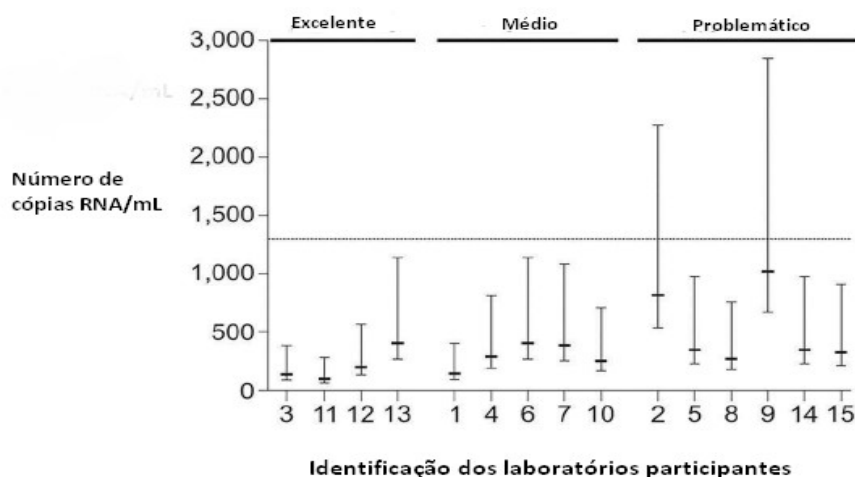
Durante o período do estudo, participamos de um teste de proficiência externo organizado pelo laboratório de virologia da Universidade Charité, Berlim, Alemanha, onde recebemos doze amostras liofilizadas com o objetivo de avaliar o diagnóstico molecular de zika vírus no Brasil. A sensibilidade foi avaliada através de quatro amostras positivas para o RNA do ZIKV contendo entre 10^3 a 10^6 cópias/mL e a especificidade através de oito amostras contendo DENV sorotipo 2, DENV sorotipo 4, vírus da encefalite Japonesa (JEV), vírus St. Louis (SLEV), vírus do Oeste do Nilo (WNV), vírus da febre amarela (YFV), Chikungunya vírus (CHIKV) e plasma negativo.

Entre os quinze laboratórios participantes, apenas quatro (27%) reportaram resultados corretos para todas as amostras e obtiveram o resultado da performance como excelente, incluindo o nosso laboratório de doenças infecciosas, aplicando o método aqui descrito, conforme demonstrado nas figuras 11 e 12.

Lab ID	Zika vírus, cópias/mL												Resultados corretos/ testes
	MRS, 8.1×10^5	MRS, 7.0×10^3	MRS, 1.3×10^3	MR766, 2.1×10^3	CHIKV	DENV-2	DENV-4	JEV	SLEV	WNV	YFV	Plasma	
	S-7	S-4	S-12	S-9	S-10	S-5	S-8	S-2	S-11	S-6	S-3	S-1	
3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	12/12
11	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	12/12
12	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	12/12
13	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	12/12
1	+	+	+	(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	11/12†
6	+	+	+	(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	11/12
10	+	+	(-)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	11/12
4	+	+	(-)	(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	10/12
7	+	+	(-)	(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	10/12
9	+	+	+	+	-	-	(+)	-	-	(+)	(+)	-	9/12
2	+	+	(-)	(-)	(+)	-	-	(+)	-	-	-	-	8/12
14	+	+	(-)	+	(+)	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	7/12
15	+	(-)	(-)	(-)	-	(+)	-	(+)	(+)	-	-	-	6/12
5	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	4/12
8	+	+	NT	+	NT	(+)	(+)	(+)	NT	(+)	(+)	(+)	3/9
Total.	15/15 (100)	14/15 (93)	8/14 (57)	9/15 (60)	11/14 (79)	12/15 (80)	12/15 (80)	11/15 (73)	12/14 (86)	11/15 (73)	11/15 (73)	12/15 (80)	Média 9.2/11.8

FONTE: adaptado de Fischer C (84), 2018

Figura 11. Resultados dos testes de proficiências externos para diagnóstico molecular para o zika vírus em quinze laboratórios do Brasil. O nosso laboratório de doenças infecciosas do estudo é o número 3.



FONTE: adaptado de Fischer C. (84), 2018

Figura 12. Performance dos laboratórios participantes do teste de proficiência externo para diagnóstico molecular para o zika vírus. O nosso laboratório de doenças infecciosas do estudo é o número 3.

Os resultados deste teste de proficiência foram publicados em maio de 2018 no periódico *Emerging Infectious Disease*(84).

4.6 Pesquisa de anticorpos ZIKV do tipo IgG

Foi optado por complementar o estudo com a avaliação retrospectiva da soroprevalência dos doadores através da realização do ZIKV IgG em cento e quarenta amostras de soro coletadas entre os meses de maio a julho de 2016 e janeiro a julho 2017, devido a sazonalidade da infecção pelos arbovirus. As amostras foram submetidas aos testes por metodologia de ELISA indireto (Euroimmun) no laboratório de medicina diagnóstica do HIAE.

A metodologia utilizada analisa de forma quantitativa os anticorpos da

classe IgG dirigidos às proteínas não-estruturais recombinantes (NS1) específicas do ZIKV. O princípio envolve duas etapas: a primeira etapa também denominada de fase sólida, o soro do paciente é adicionado aos poços da microplaca de poliestireno contendo o NS1 do ZIKV. Caso a amostra seja positiva, anticorpos humanos específicos se ligam a estes antígenos. Na segunda etapa, adiciona-se um conjugado composto de anticorpo dirigido contra imunoglobulinas humanas, no caso os anticorpos específicos do ZIKV ligado à enzima peroxidase. Ao adicionar o substrato da enzima peroxidase, ocorre a reação de cor (Figura 13). Os resultados obtidos são avaliados de forma quantitativa pela leitura espectrofotométrica das densidades ópticas (DO) das amostras. As DOs são comparadas com as leituras do calibrador para determinar os resultados dos controles positivos e negativos e das amostras.

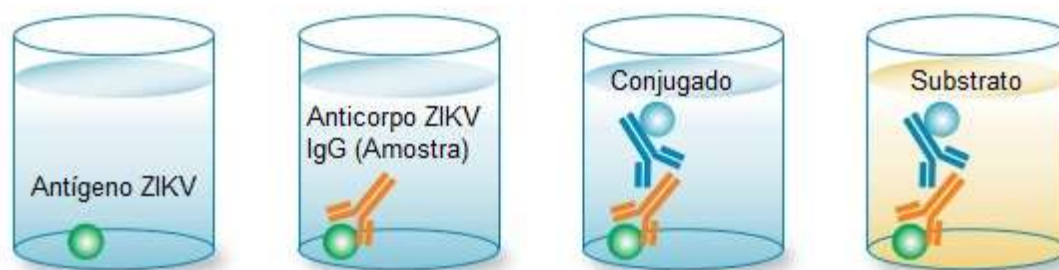


Figura 13. Princípio do método de ELISA indireto para detecção do ZIKV IgG

Segundo o fabricante, a especificidade deste teste é de 100% e a sensibilidade também de 100%.

4.7 Pesquisa de anticorpos DENV do tipo IgG

As amostras positivas para ZIKV do tipo IgG foram também submetidas a pesquisa quantitativa de anticorpos para o DENV do tipo IgG através da metodologia ELISA indireto (Abbott) utilizando o kit *Panbio Dengue Early ELISA* no laboratório de medicina diagnóstica do HIAE. Este teste é capaz de detectar anticorpos IgG para os diferentes sorotipos de antígeno da dengue (1, 2, 3 e 4).

Este ensaio é um ELISA indireto com os mesmos princípios descritos previamente para a pesquisa do ZIKV IgG.

Segundo o fabricante, a especificidade deste teste é de 100%, a sensibilidade nas infecções secundárias é de 97,9% e nas infecções primárias de 33,3%.

4.8 Pesquisa de anticorpos ZIKV do tipo IgM

As amostras positivas para ZIKV IgG foram submetidas ao teste para ZIKV IgM através de metodologia ELISA utilizando o kit *ZIKV Detect™2.0 IgM Capture* (Inbios) no Vitalant Research Institute (San Francisco, USA) com o objetivo de pressupor a presença de anticorpos ZIKV IgM e diferenciá-los de anticorpos IgM de outros Flavivirus(85, 86)

O princípio do teste baseia-se na detecção qualitativa dos anticorpos da classe IgM dirigidos contra glicoproteínas do envelope viral. Na primeira etapa do teste, um controle positivo, um controle negativo e as amostras a serem estudadas são diluídas em solução disponibilizada no produto, incubadas e lavadas dentro de poços de poliestireno revestidos com anticorpos policlonais contra uma IgM humana. Esta etapa é realizada em triplicata. Na segunda etapa, o antígeno recombinante do ZIKV pronto para uso (RTU, do inglês *Ready to Use*), o antígeno de controle de reação cruzada (CCA, do inglês *Cross Reaction*

Control Antigen) e o antígeno normal de células (NCA, do inglês *Normal Antigen Control*) são adicionados separadamente em todos dos poços. Na terceira etapa, uma solução secundária de anticorpos pronta para uso é adicionada. A quarta etapa consiste na adição do conjugado contendo anticorpo ligado à enzima peroxidase. Uma solução ácida de parada serve para determinar o grau de rotatividade da enzima medida através de densidade óptica a 450 nanômetros. Caso haja anticorpos ZIKV do tipo IgM na amostra, haverá formação de um complexo composto por IgM, antígeno, anticorpo secundário e conjugado. Para obtenção do resultado é utilizado um leitor de microplaca onde avalia-se os valores de densidade óptica a 450 nanômetros (OD₄₅₀) dos poços contendo os diferentes antígenos RTU, CCA e NCA, categorizando assim a amostra.

O resultado do ZIKV IgM ISR (do inglês, *Immune Status Ratio*) é calculado através da relação de densidade óptica encontrada nas amostras que contém o antígeno recombinante do ZIKV (ZIK AG DO₄₅₀) e o antígeno de controle de reação cruzada (CCA DO₄₅₀). A medida ZIKV CCA/NCA é calculada pela relação de densidade óptica encontrada nas amostras que contém o antígeno de controle de reação cruzada (CCA DO₄₅₀) e o antígeno controle normal (NCA DO₄₅₀).

A interpretação final do teste ZIKV IgM Detect™ 2.0 IgM Capture é baseada nos resultados encontrados o ZIKV IgM ISR e do ZIKV IgM CCA/NCA, onde caso o zika IgM ISR $\geq 1,70$ considera-se presunção positiva para ZIKV, se zika ISR $< 1,70$ e ZIKV CCA / NCA $\geq 5,00$, considera-se presunção positiva para outros flavivírus e se zika ISR $< 1,70$ e CCA/NCA $< 5,00$, o resultado é considerado zika negativo.

Segundo o fabricante, a especificidade deste teste é superior a 96% e a sensibilidade é superior a 90%.

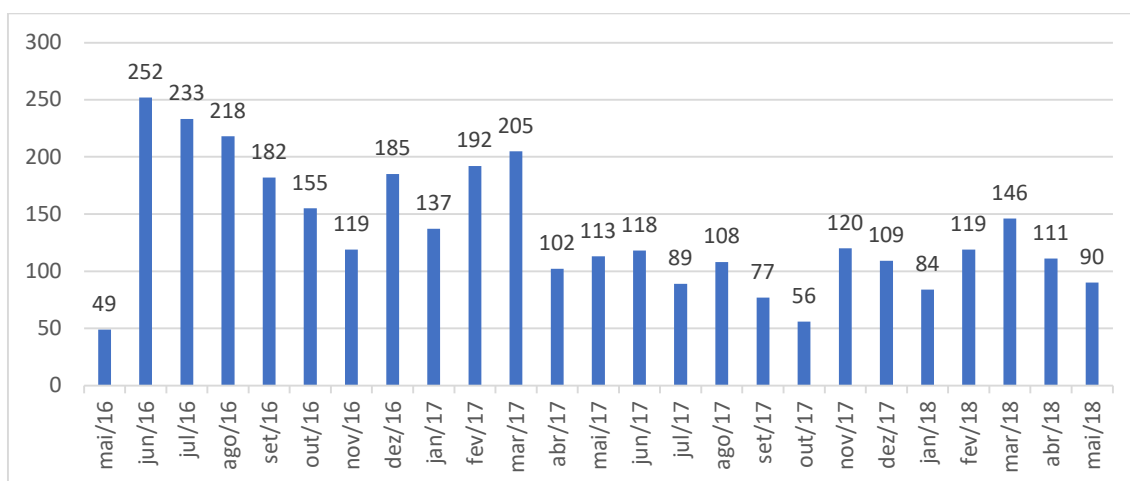
5 RESULTADOS

Realizada validação interna da técnica de RT-PCR em tempo real *in house* com padronização de diluições dos reagentes utilizados, controle interno, controles positivos e negativos e soluções utilizadas durante a extração e amplificação antes da implementação do teste.

Entre vinte e três de maio de 2016 e trinta e um de maio de 2018 foram testadas 3.369 amostras de 3.221 de doadores de sangue do Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular do Hospital Israelita Albert Einstein. O cálculo amostral foi realizado utilizando intervalo de confiança, 95%; supondo a prevalência do ZIKV RNA de 5%.

A distribuição do número de amostras coletadas por mês de coleta está demonstrada na Tabela 6.

Tabela 6. Distribuição do número de amostras coletadas por mês nos anos de 2016, 2017 e 2018



A distribuição das variáveis de sexo, faixa etária, tipo de doador e produto coletado dos 3.221 doadores que participaram do estudo estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Distribuição dos doadores participantes do estudo quanto às variáveis: sexo, faixa etária, tipo de doador e produto coletado

Variável	Número de doadores	%
Sexo		
Masculino	1471	45,67
Feminino	1750	54,33
Faixa etária		
<18 anos	18	0,56
18-29 anos	873	27,10
30-39 anos	1036	32,16
40-49 anos	775	24,06
50-59 anos	434	13,47
> 60 anos	85	2,64
Tipo de doador		
Primeira vez	1578	48,99
Repetição	1159	35,98
Esporádico	484	15,03
Tipo de produto coletado		
Sangue total	3202	99,41
Produtos por aférese	19	0,59
Total de doadores	3221	100

5.1 RT-PCR em tempo real para detecção do RNA do zika vírus

Das 3.369 amostras testadas, trinta e uma foram consideradas falso positivas (0,92%), pois foram repetidas em duplicata e não foi confirmada a positividade inicial. Retrospectivamente, estas 31 amostras também foram testadas pela metodologia molecular de amplificação mediada por transcrição (TMA do inglês *Transcription-Mediated Amplification*) para o ZIKV RNA através

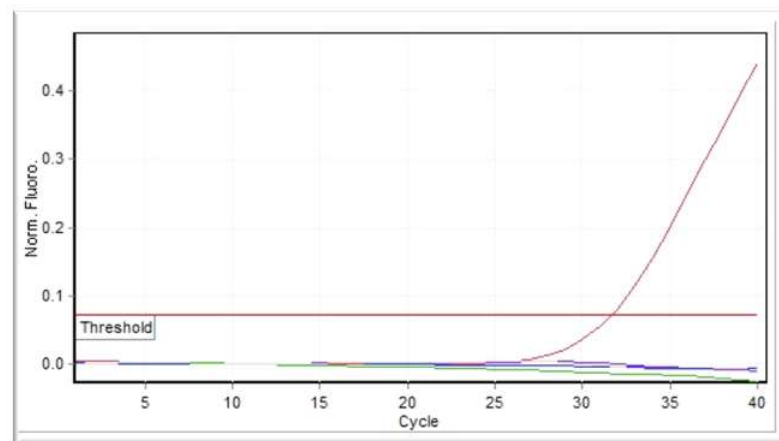
de teste comercial Aptima® zika Virus Assay(Hologic) no Vitalant Research Institute (San Francisco, USA) e foram confirmadas como negativas.

Quatorze amostras (0,41%) tiveram seus resultados invalidados por falhas no controle interno da reação, quatro (0,12%) havia volume insuficiente para testagem o que impossibilitou a realização do teste e em duas (0,05%) houve falha no pipetador automático.

Em nenhuma amostra foi detectado o RNA do zika vírus.

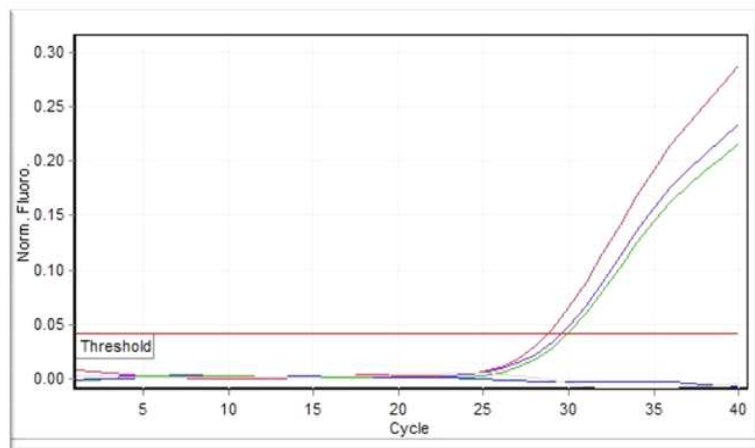
As curvas de amplificação e resultados das corridas para o ZIKV e para o póliovirus (PV) estão exemplificadas nos Gráficos 1 e 2.

Gráfico 1. Curva de amplificação e resultados para o zika vírus



No.	Color	Name	Type	Ct
1	Red	CTRL POS	Unknown	31.64
2	Purple	CTRL NEG	Unknown	
3	Green	=B30011833503347	Unknown	
4	Blue	wipe	Unknown	
5	Grey	Agua	Unknown	

Gráfico 2 -Curva de amplificação e resultados para o póliovírus, demonstrando o funcionamento do controle de extração e consequente validação da extração do RNA viral.



No.	Color	Name	Type	Ct
1	Red	CTRL POS	Unknown	28.78
2	Blue	CTRL NEG	Unknown	29.55
3	Green	-B30011833503347	Unknown	29.92
4	Yellow	wipe	Unknown	
5	Grey	Água	Unknown	

Uma análise dos desvios padrões do *Cycle Threshold*(Ct) dos controles positivos (N= 28, média Ct = 30.8; DP Ct = 0.94) e dos controles internos (N= 471, Média Ct = 28.0; DP Ct= 1.37) demonstrou valores de desvios padrão (DP) entre +2 e - 2, comprovando a reprodutibilidade do teste.

5.2 Pesquisa de anticorpos ZIKV IgG, DENV IgG e ZIKV IgM

A soroprevalência do zika vírus foi avaliada através de cento e quarenta amostras do estudo coletadas aleatoriamente entre os meses de maio a julho de 2016 e janeiro a julho 2017, conforme distribuição demonstrada na Tabela 8. Sete (5%) amostras foram positivas.

Tabela 8. Distribuição do número de amostras testadas para o ZIKV IgG (Euroimmun) por mês

Mês/ano	Número de amostras coletadas
mai/16	4
jun/16	18
jul/16	28
jan/17	12
fev/17	13
mar/17	8
abr/17	13
mai/17	10
jun/17	15
jul/17	19
Total	140

Entre as 7 amostras ZIKV IgG positivas, seis amostras foram positivas para o DENV IgG e 4 tiveram a interpretação final como de presunção de ZIKV pelo ZIKV IgM, conforme demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados dos testes de avaliação da soroprevalência do zika vírus e interpretação

6 DISCUSSÃO

O zika vírus está incluído no grupo das arboviroses, que deriva do acrônimo *arthropod borne viruses* devido ao seu modo de transmissão principal ocorrer através de vetores artrópodes, assim com o vírus da Dengue, Chikungunya e o vírus da febre amarela (YFV, do inglês *Yellow Fever Virus*). Estudos sobre a previsão de distribuição geográfica para próximas décadas dos mosquitos do gênero *Aedes*, considerados os principais vetores em áreas urbanas, demonstram que eles continuarão expandindo para regiões temperadas e frias devido às mudanças climáticas, urbanização e deslocamento populacional, favorecendo a disseminação da infecção e sendo responsáveis por grandes epidemias em populações susceptíveis(87). Esta perspectiva de expansão territorial global dos vetores dos arbovírus indica a necessidade do controle do

Amostra	Data da coleta /mm/aa)	ZIKV RNA	ZIKV IgG	DENV IgG	ZIKV IgM (ISR)	ZIKV IgM (CCA/NCA)	Interpretação dos resultados para o ZIKV IgM
304408	06/16	Negativo	Positivo	Negativo	1,086	1,208	Negativo
303316	05/16	Negativo	Positivo	Positivo	17,176	1,085	Presunção zika positivo
312479	01/17	Negativo	Positivo	Positivo	7,271	1,157	Presunção zika positivo
312935	01/17	Negativo	Positivo	Positivo	0,202	7,915	Presunção outros flavivirus
313154	01/17	Negativo	Positivo	Positivo	3,422	1,071	Presunção zika positivo
320658	07/17	Negativo	Positivo	Positivo	2,144	1,667	Presunção zika positivo
320662	07/17	Negativo	Positivo	Positivo	0,833	1,333	Negativo

agente transmissor a nível mundial, além das estratégias de saúde pública adotadas para conter as infecções decorrentes.

Durante epidemias destas arboviroses, a descrição de altas taxas de doadores virêmicos gerou um alerta para os serviços de hemoterapia sobre a possibilidade de transmissão transfusional e a necessidade de implementação de medidas eficazes para garantir a segurança dos receptores de sangue e hemocomponentes. Neste cenário, a maior resposta da comunidade transfusional a uma arbovirose ocorreu diante da evidência inquestionável e de repercussões clínicas agressivas da TT pelo Vírus do Oeste do Nilo nos EUA em 2002(55) e a consequente implementação universal do NAT como triagem laboratorial de doadores de sangue em 2003(77), medida esta seguida por outros países europeus(88, 89). Estratégias diferentes foram adotadas durante epidemia do CHKV entre 2005-2007 nas Ilhas Reunión e no Nordeste da Itália quando foi suspensa a coleta de sangue nas áreas acometidas como medida de precaução(56) e os componentes eritrocitários e plasmáticos passaram a ser supridos pelo *Établissement Français du Sangue*, o Serviço Nacional de Transfusão da França. Devido a meia-vida de 5 dias dos componentes plaquetários foi implantada a tecnologia de inativação de patógenos para estes componentes coletados por aférese(67, 90).

A transmissão transfusional pelo ZIKV foi comprovada através do relato de dois casos ocorridos no Brasil nos anos de 2015 e 2016(52, 53) onde houve a comprovação do ZIKV RNA nas amostras de doadores e receptores e a análise de sequência genômica do vírus demonstrou similaridade entre as cepas. Nestes dois relatos também ficou clara a importância da informação pós-doação para o processo de retrovigilância e que em áreas com alta prevalência da infecção

apenas a análise genômica é capaz de comprovar a transmissão transfusional. Para redução do risco de TT-ZIKV, várias estratégias foram utilizadas nas áreas com transmissão ativa do vírus, incluindo a aplicação de questionário médico e exame físico pré-doação, informação pós-doação, tecnologia de inativação de patógenos e testes de triagem molecular *in house* e comercial para o ZIKV(54, 58, 60). O questionário médico e exame físico pré-doação tem um baixo valor preditivo positivo para sintomas da infecção devido a proporção 1:3 de doadores sintomáticos:assintomáticos(46), porém auxilia na identificação dos potenciais viajantes infectados provenientes de áreas de risco e dos contatos sexuais com pessoas infectadas.

No segundo semestre do ano de 2015, o Brasil foi acometido pela epidemia do zika vírus sendo marcada pela descoberta da correlação entre a infecção e sintomas neurológicos graves, denominada de síndrome congênita do ZIKV que jamais havia sido descrita em outras arboviroses. Dados do Ministério da Saúde brasileiro via Boletim Epidemiológico de monitoramento das principais arboviroses demonstravam que 18 dos seus 26 Estados, incluindo o Distrito Federal apresentavam casos autóctones confirmados da infecção naquele ano(81). Diante deste cenário, a ausência de testes comerciais disponíveis para ZIVK RNA em doadores de sangue e com o objetivo de garantir a segurança transfusional, nós conduzimos um estudo para avaliar a prevalência de viremia de doadores do Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular (DHTC) do Hospital Israelita Albert Einstein através de um teste de RT-PCR desenvolvido no nosso laboratório de doenças infecciosas para detecção do ZIKV RNA em amostras individuais. Esta estratégia de utilizar o NAT ZIKV em amostras

individuais havia sido adotada em outras epidemias como nas Ilhas Martinica(47), em Porto Rico e posteriormente em todo território americano diante do avanço da epidemia no país no início do ano de 2016(50, 58, 60).

A escolha da metodologia de RT-PCR em tempo real em passo único foi devido a disponibilidade dos equipamentos e insumos no DHTC e o tempo de liberação dos resultados dos testes o que impacta diretamente na distribuição dos hemocomponentes testados para transfusão. Como medidas adicionais para garantir a qualidade da técnica realizamos:

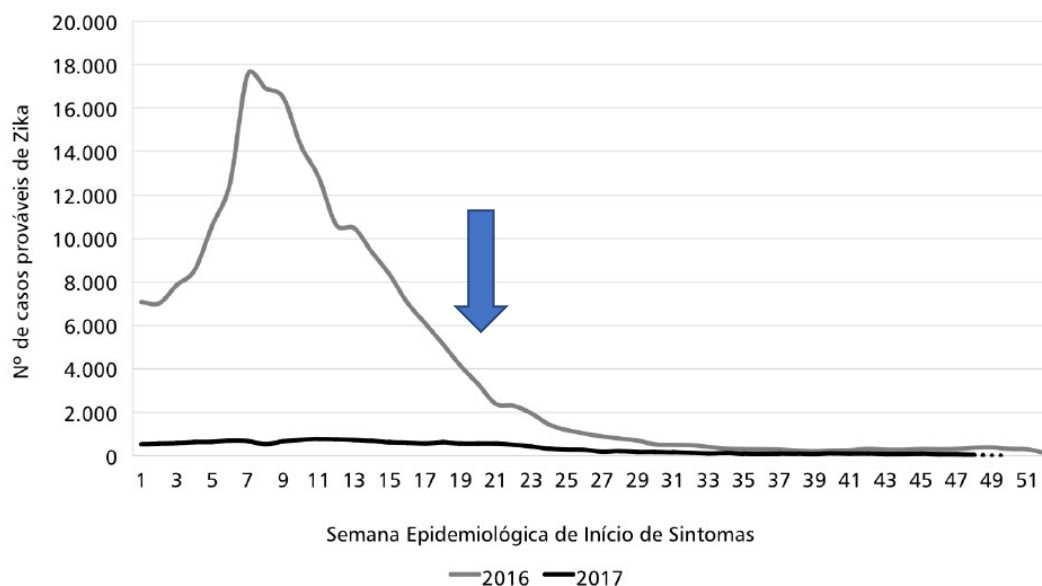
- Controle interno da extração com o vírus da pólio da vacina Sabin, reduzindo assim os riscos de falsos negativos. Além disso, as análises dos Ct das curvas de amplificação para o póliovirus apresentam um baixo desvio-padrão, demonstrando a sua reprodutibilidade e comprova que este controle interno pode ser utilizado.
- Etapa de extração com kit *DSP Virus/Pathogen MidiKit*(Qiagen) onde é requerido um volume de 1.000 microlitros de amostra de plasma, aumentando a sensibilidade do teste.
- O limite de sensibilidade calculado através da *Probit Analysis* foi de 153UI/mL(intervalo de confiança de 95%) o que corresponde a 99,99% de sensibilidade para detecção de carga viral. Trabalhos que analisaram a carga viral nas amostras de doadores de sangue encontraram níveis de 10^2 a 10^7 cópias/mL de ZIKV, estando em nível intermediário quando comparado com as cargas virais de infecções pelo vírus do Oeste do Nilo e o HIV, por exemplo(77).

Apesar disso, o número de cópias necessário para infectar os receptores de sangue ainda permanece desconhecido.

A coleta das amostras teve início no dia 23 de maio de 2016, sendo que a grande maioria das amostras dos doadores de nossa casuística foram obtidas durante os meses de junho e julho de 2016, como está demonstrado na Tabela 6. A nossa casuística foi de 3.369 amostras de plasma coletadas e testadas de 3.221 doadores de sangue considerados aptos à doação de sangue e em nenhuma amostra foi detectado o ZIKV RNA. O estudo demonstrou uma baixa prevalência de viremia pelo ZIKV na nossa população de doadores de sangue durante o período de epidemia registrada no Brasil em 2016. Este resultado difere de outros previamente descritos na literatura como o da Polinésia Francesa e o de Ribeirão Preto, onde as taxas atingiram aproximadamente 3% (46, 51), entretanto foi similar a ocorrência descrita nas regiões brasileiras do Centro-Oeste (91), Sul (92) e Sudeste(93), sugerindo uma distribuição geográfica diferente para o vírus.

Quando acessamos os dados do número de casos autóctones do ZIKV na cidade de São Paulo fornecidos pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), publicados no Boletim epidemiológico de monitoramento das principais arboviroses e demonstrado no Gráfico 3, evidenciamos que apenas treze casos da infecção foram notificados na cidade de São Paulo em 2016, 3 casos em 2017 e zero em 2018, considerando a população total de 11 milhões de habitantes. Dos treze casos notificados em 2016, oito(61,5%) aconteceram entre janeiro e abril (semana 4 e 12), ou seja, antes do início da coleta de dados para este estudo. Estes dados sugerem que a taxa de

prevalência de 0% de viremia para o ZIKV encontrada reflete o baixo número de casos de infecção na cidade de São Paulo durante os anos de 2016, 2017 e 2018.



FONTE: adaptado do SINAN NET, 2017

Gráfico 3. Casos prováveis de febre pelo zika vírus na cidade de São Paulo por semana epidemiológica do início dos sintomas, Brasil, 2016 e 2017.

Adicionalmente, avaliamos a taxa de soroprevalência dos nossos doadores através da testagem do ZIKV IgG em cento e quarenta amostras coletadas entre os meses de maio a julho de 2016 e janeiro a julho 2017 e obtivemos uma taxa de 2,85% (4/140) de presunção do ZIKV. O ZIKV IgG ainda permanece como teste de escolha para avaliar exposição progressa e o objetivo de realizá-lo foi fornecer dados suplementares de vigilância da população estudada devido ao seu longo tempo de permanência na circulação. É especialmente importante considerar a possibilidade de reação cruzada com outros flavivírus e, portanto, sua distinção é necessária através de testes complementares, como os realizados no nosso estudo. Quando comparamos nossos resultados com a

literatura, observamos que em regiões sem transmissão ativa, a prevalência do ZIKV IgG em doadores de sangue alcança taxas entre 0.001 a 0.003% (49, 50) como as encontradas nos EUA, mas em áreas com circulação ativa como no continente Africano este número pode chegar a 4,89%(94).

Como limitações do nosso estudo identificamos que houve um viés de seleção quanto aos dias de coletas das amostras: segundas, terças, quartas e quintas-feiras devido a facilidade e logística na realização dos testes e liberação dos hemocomponentes para transfusão. Relatórios de produtividade do Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular do HIAE demonstram que cerca de 48% dos candidatos a doação de sangue comparecem às sextas e aos sábados. Entretanto, entendemos que este viés de seleção não inviabiliza os nossos resultados encontrados de baixa prevalência devido ao grande número de amostras avaliadas (3.369) durante o período do estudo.

Alguns aspectos permanecem incertos na história da transfusão e ZIKV como o real risco de transmissão e o impacto clínico da transmissão transfusional em receptores de sangue. Modelos matemáticos avaliaram o risco transfusional de outras arboviroses como para o WNV, DENV e CHKV através de fórmulas que correlacionavam a prevalência de doadores assintomáticos virêmicos e a duração do período de viremia(45). Nestes modelos assume-se que todas as doações virêmicas são capazes de causar infecções. Para o WNV, o primeiro modelo foi proposto em 1999 com estimativa de risco máximo e médio de 2,7 e 1.8 a cada 10.000 doações, respectivamente(95) e foi atualizado em 2002 para um risco médio de 2,12 a 4,76 a um risco máximo de 4,32 a 10,46 a cada 10.000 doações(96). Para o ZIKV, Magnus e cols. demonstraram a existência de risco

residual de TT -ZIKV em Campinas, cidade do interior do Estado de São Paulo, onde foi descrito o primeiro caso de TT-ZIKV em 2015. Este estudo realizado durante o período de baixa circulação do vírus avaliou a prevalência de viremia por metodologia de RT-PCR em 2.000 amostras de doadores de sangue e demonstrou 0,16% (3/200) de positividade(97).

O impacto clínico da TT-ZIKV em receptores de sangue de componentes ZIKV RNA+ apesar de possível, ainda não foi documentado. Um estudo retrospectivo realizado na Polinésia Francesa(54) acompanhou 12 receptores de sangue com TT-ZIKV onde não foi evidenciada manifestação clínica nestes pacientes, semelhante aos dados dos dois casos de TT-ZIKV descritos no Brasil. Se avaliarmos o comportamento de outro flavivírus como o DENV, um estudo controlado de doadores de sangue no Brasil avaliou a taxa de TT-DENV como sendo de 29% e neste estudo não houve diferença clínica entre os receptores DENV RNA positivo e DENV RNA negativo(98). Alguns trabalhos sugerem que esta ausência de sintomas e sinais clínicos da TT-DENV pode ocorrer devido ao tipo de exposição ao vírus: parenteral derivada do sangue humano versus a derivada da exposição cutânea do indivíduo. Esta injúria local associada a saliva do mosquito geraria um padrão de glicosilação na superfície viral com inflamação que seriam fatores capazes de aumentar a replicação viral sistêmica e aumento do potencial de infecção.(99-101). Apesar desta justificativa, duas recentes publicações sobre TT-DENV demonstraram que, apesar de raros, sinais e sintomas clínicos podem acontecer em receptores de sangue, sendo geralmente sintomas leves de doença febril e não foi evidenciado complicações mais graves da doença como a febre hemorrágica do dengue (DFH, do inglês *Dengue*

Hemorrhagic Fever) ou síndrome do choque da dengue (DSS, do inglês Dengue Shock Syndrome) (102, 103).

Devido ao impacto clínico de TT-ZIKV em receptores ser desconhecido, o princípio da precaução deve ser adotado nos serviços de hemoterapia onde medidas para minimizar este risco devem ser instituídas o mais precocemente possível em situações de epidemias, especialmente em populações susceptíveis. Portanto, considerando a severidade das possíveis manifestações neurológicas do ZIKV em fetos e recém-nascidos, a adoção de protocolos com indicações do uso de hemocomponentes ZIKV RNA negativo para gestantes é justificado e foi recomendado pela OMS em 2016.(44);

No Brasil, regulamentações de órgãos governamentais quanto às medidas de prevenção ainda são escassas o que exige iniciativas individuais no desafio de conter a TT pelo ZIKV. Atualmente, temos disponíveis no Brasil a triagem clínica, informação pós-doação, testes moleculares *in house* para detecção do ZIKV e a tecnologia de inativação de patógenos para concentrados de plaquetas e plasma fresco congelado. Os testes moleculares comerciais estão amplamente disponíveis fora do Brasil, mas ainda não foram aprovados para doadores de sangue pela ANVISA⁴. A tecnologia de inativação de patógenos surgiu como uma grande promessa para resolver o problema de transmissão transfusional das chamadas doenças emergentes quando métodos diagnósticos complementares não foram factíveis, entretanto sua utilização ainda permanece limitada devido a restrição da aplicação nos concentrados de hemácias.

⁴ Dados atualizados até novembro de 2020.

5 CONCLUSÕES

O nosso estudo demonstrou que a metodologia de RT-PCR em tempo real *in house* validada e utilizada possui boa performance, resultados reprodutíveis e comparáveis a outros laboratórios e, portanto, consiste em uma alternativa factível a ser utilizada na rotina de triagem laboratorial de doadores de sangue, quando testes sob investigação ou comerciais não estiverem disponíveis.

O conhecimento da prevalência virêmica local auxilia na tomada de decisão quanto às medidas de prevenção de TT durante epidemias e a baixa prevalência encontrada decorre do baixo número de casos autóctones na cidade de São Paulo no período estudado.

A avaliação da soroprevalência através da pesquisa do ZIKV IgG fornece informação sobre a exposição da população estudada e sempre deve ser acompanhada da pesquisa de reações cruzadas com outros flavivírus.

Nossos dados indicam que não há necessidade de utilização universal de testes moleculares para detecção do ZIKV RNA durante o período do estudo na Cidade de São Paulo. Entretanto um teste NAT genérico com cobertura para um grupo amplo de flavivirus que circulam na região como o DENV, YFV poderia ser útil.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Outros trabalhos podem ser desenvolvidos utilizando a metodologia aplicada neste estudo. A pesquisa de outras arboviroses que circulam no Brasil como o dengue vírus e o chikungunya vírus pode ser realizada através do PCR em tempo real *in house* aplicada na triagem laboratorial de doadores de sangue. O acompanhamento da divulgação do Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde e divulgado no *website* da Anvisa fornece informações que auxiliam na identificação do aumento do número de casos notificados como suspeitos e confirmados das principais arboviroses e dá subsídios para a definição do momento de início da epidemia e conseqüentemente a necessidade de testagem dos doadores.

7 ANEXOS

Anexo A- Triagem clínica de doador de sangue do Hospital Israelita Albert Einstein



Triagem Clínica de Doador

Nome: _____

 RG: _____
 Código Doador: _____
 Data ____/____/____.

Questionário	Sim	Não	Observação
IA - Horário do início de triagem:			
A1 - Qual é a forma de convocação?			
AA - Sente-se bem hoje? Dormiu bem?			
AB - Já doou sangue anteriormente?			
A3 - Local de Doação: HIAE / Outro Serviço/ HIAE e ou outro Serviço			
A7 - Quando? Que tipo de Doação?			
A4 - Está em jejum? Qual foi a última refeição / horário			
AC - Faz uso diário ou fez uso hoje de bebida alcoólica?			
AD - Teve febre ou infecção nos últimos 15 dias?			
GA - Já sentiu-se mal durante/após doação de sangue?			
GF - Em que momento?			
GB - Tem / Teve resultado positivo na sorologia?			
AD - Teve febre ou infecção nos últimos 15 dias?			
AE - Fez tratamento dentário na última semana?			
AJ - Seu ciclo menstrual é regular?			
AK - Seu fluxo sanguíneo é normal ou intenso?			
AL - Existe a possibilidade de estar grávida atualmente?			
AF - Teve parto / aborto há menos de 3 m/Está amamentando?			
AG - Está grávida ou teve gestação/aborto prévios?			
GC - Quantas gestações prévias?			
GG - Quantos abortos prévios?			
HB - Há quanto tempo foi a última gestação ou aborto?			
HA - Informações aos setores de coleta e processamento			
AH - Exerce profissão na qual mal-estar tenha risco?			
BA - Tem ou teve doença grave?			
BB - Já foi submetido à cirurgia?			
BC - Teve algum problema de saúde, febre, dor articular, conjuntivite, dor muscular, rash cutâneo no último mês?			
DI - Nos últimos 6 meses teve diagnóstico ou suspeita de infecção pelos vírus: Dengue, Zika, Chikungunya, Vírus do Nilo Ocidental ou Febre Amarela?			
DJ - Nos últimos 90 dias seu parceiro (a) sexual teve Zika ou sintomas sugestivos da doença?			
BD - Fez procedimento endoscópico ou cirurgia laparoscópica nos últimos 6 meses?			
BE - Tem / Teve doença respiratória / alérgica/ de pele?			
2A - Tem/ Teve a síndrome da fadiga crônica?			
BF - Tem/ Teve câncer/ tumor?			
BG - Tem/ Teve doença renal, urinária, ginecológica?			
BH - Tem/ Teve diabetes/doença endócrina?			
BI - Tem/ Teve doença cardíaca/ hipertensão arterial?			
BJ - Tem/ Teve doença de sangue ou hemorrágica?			
BK - Tem/ Teve doença neurológica/ desmaios/ convulsões?			
BL - Já teve Brucelose?			
CA - Fez/ Faz uso recente/crônico de medicamento?			
CB - Fez uso de medicamento com AAS ou algum antiinflamatório não hormonal nos últimos 3 dias?			
CC - Fez uso de Accutane / Roacutan nos últimos 30 dias?			
CD - Fez uso de Finasterida nos últimos 30 dias?			
CE - Já usou Tegison / Neotigason, hormônio de crescimento?			
CF - Foi vacinado/recebeu soro antitetânico nos últimos 30 dias?			
CG - Recebeu vacina anti-rábica há menos de 1 ano?			
CH - Recebeu transfusão de sangue há menos de 1 ano?			

Triagem Clínica de Doador

CI - Recebeu hemoderivados há menos de 1 ano?		
DA - Teve hepatite/ Icterícia após os 11 anos de idade?		
DB - Tem/ Teve Malária/ Babesiose?		
DC - Tem/ Teve doença ou teste positivo p/ Chagas?		
DD - Você ou familiar tem/teve doença Creutzfeldt-Jacob?		
DE - Tem / Teve algum resultado positivo para AIDS?		
DF - Tem/teve gânglios/febre/tosse e dispnéia e sudorese nos últimos meses?		
DH - Teve diarreia, perda de peso, lesão de pele / mucosa nos últimos meses?		
EA - Nasceu/viveu na África a partir de 1977?		
EB - Teve parceiros sexuais que morou / nasceu na África a partir de 1977?		
EC - Viajou nos últimos 12 meses? P/ onde?		
ED - Ficou mais de 3,m no Reino Unido de 1980 a 96?		
EE - Morou em algum país da Europa a partir de 1980?		
EF - Já recebeu transplante órgão/ enxerto/ implante?		
EG - Você morou em zona rural fora do Estado SP? Onde?		
GD - Morou em casa pau-a-pique/ Havia barbeiro na casa?		
GE - Algum familiar seu tem/teve Doença de Chagas?		
FA - Fez tatuagem, maquiagem definitiva no último ano?		
FN - Já fez <i>piercing</i> alguma vez, em qual local, há quanto tempo?		
A5 - Sabe o que significa Janela Sorológica?		
FB - Teve contato íntimo ou social com portador hepatite no último ano?		
FC - Teve ou tem herpes?		
FQ - Teve doença sexualmente transmissível (DST) no último ano?		
FD - H: Teve relação sexual com outro homem no último ano?		
FE - Teve relação sexual com garota de programa no último ano?		
FF - Teve relação sexual com parceiros (as) ocasionais ou desconhecidos (as) e seus respectivos parceiros (as) no último ano?		
FG - Teve relação sexual com portador/risco p/ AIDS no último ano?		
A6 - Teve relação sexual com parc.recebeu sg, hemodervado ou é politransfundido?		
FO - Teve relação sexual c/ parceiro que realiza/ realizou hemodíalise no último ano?		
FH - Usa/usou ou teve contato sexual com usuário de drogas injetável/ ilícita / no último ano?		
FI - Já foi preso / internado em casa de recuperação no último ano?		
FJ - Usou anabolizante ou droga ilícita não injetável no último ano?		
FM - Os MMSS apresentam múltiplas lesões puntiformes pigmentadas?		
FK - Teve acidente perfuro-cortante há menos de 1 ano?		
FL - Veio doar sangue só p/ obter resultados para AIDS?		
Inserir os valores obtidos		
MA - Dosagem de hemoglobina		<i>g/dl</i>
MB - Valor do hematócrito		<i>%</i>
MC - Contagem de plaquetas		<i>mm³</i>
MD - Contagem de leucócitos		<i>mm³</i>
ME - Peso		<i>kg</i>
MF - Altura		<i>cm</i>
MG - Temperatura		<i>°C</i>
MH - Frequência cardíaca		<i>bpm</i>
MI - Pressão arterial (SISTOLICA)		<i>mmHg</i>
MI - Pressão arterial (DIASTOLICA)		<i>mmHg</i>
ML - Observações do doador		
MM - Observações especiais para processamento		
MO - E um doador de reposição?		
1A - Deseja incluir HLA de plaquetas para esse doador?		
VO – Voto manual de Auto-exclusão respondido?	() Sim () Não, doador inapto	
Voto inserido no sistema	() Sim Resp:	
IB – Horário do término da triagem:		

Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para doação de sangue total e hemocomponentes no Hospital Israelita Albert Einstein



Triagem Clínica de Doador

Termo de Consentimento Livre Esclarecido para Doação de Sangue Total e Hemocomponentes

() APROVADO Declaro que:

- Li o folheto "Informações Sobre a Doação de Sangue ou Aférese (BA.TEC.498)"
- Entendi os expostos descritos nos Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) para Doação Alogênica de Célula Tronco Hematopoética (CTH alo) e no TCLE para Doação Autóloga de Células Tronco Hematopoética (CTH auto) (se coleta de medula óssea ou células progenitoras de sangue periférico), no TCLE para Doação por Aférese (coleta de plaquetas e múltiplos componentes) e no TCLE para Doação de Granulócitos (coleta de granulócitos).
- Entendi as questões acima formuladas e **afirmo que as informações por mim prestadas são verdadeiras.**
- Entendi o que me foi explicado sobre o procedimento de:
 - () Doação de Sangue Total () Doação de Plaquetas () Doação de Múltiplos componentes
 - () Doação de Granulócitos () Doação de Linfócitos
 - () Coleta de CPTH – sangue periférico () Coleta de CPH – medula óssea

Estou ciente que a doação traz poucos riscos para o doador. Porém, eventualmente, intercorrências podem ocorrer em cerca de 3% das doações de sangue total, segundo dados do nosso serviço, sendo a maioria de leve intensidade. As principais reações adversas são: formação de hematoma (0,9% casos), dor ou inflamação no local puncionado; sintomas como tontura, náuseas, vômitos, queda de pressão, desmaio e outros (reação vaso-vagal leve – 1,8 % casos).

- Tive a oportunidade de esclarecer minhas dúvidas e estou ciente que tenho o direito de recusar a realização ou continuação do procedimento acima a qualquer momento.
- Li no folheto informativo Sobre a Doação de Sangue (BA.TEC.498), estou ciente e concordo que, de acordo com a legislação e normas técnicas vigentes, em toda e qualquer doação efetuada são realizados os seguintes exames laboratoriais: tipagem sanguínea ABO e Rh, pesquisa de anticorpos irregulares, detecção de hemoglobinas anormais, testes sorológicos para agentes infecciosos que podem ser transmitidos pelo sangue - hepatite B, hepatite C, doença de Chagas, sífilis, AIDS (HIV), HTLV I/II, o que inclui a detecção de ácido nucleico (NAT) para hepatite B, hepatite C e HIV. Além disso, é realizado um teste não obrigatório pela legislação vigente, teste de hemoglobina glicada (HbA1c).Estou ciente que estes testes poderão não ser realizados em algumas situações como, por exemplo, doação incompleta. Estou ciente que os exames laboratoriais realizados na doação têm a finalidade de garantir um sangue o mais seguro possível para o paciente que recebe a transfusão.
- Entendi e estou ciente que pode haver resultado alterado (falso positivo / positivo) ou inconclusivo nos testes sorológicos para os agentes infecciosos acima mencionados. Estou ciente e concordo que, nesta situação, poderei ser convocado pelo banco de sangue (Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular do Hospital Israelita Albert Einstein) ou por órgão de vigilância em saúde em situações de retrovigilância para busca ativa para a repetição destes testes e/ou realização de testes confirmatórios.
- Autorizo a incorporação dos meus dados cadastrais ao arquivo de doadores local e nacional.
- Estou ciente e concordo que meu sangue ou parte dele pode ser enviado para produção de hemoderivados ou reagentes legalmente autorizados caso não seja utilizado para transfusão. Estou ciente que, para que meu sangue seja utilizado em pesquisa, é necessário que eu assine um termo de consentimento específico após estar devidamente esclarecido.
- Autorizo a coleta do meu sangue ou de parte dele para uso a critério do Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular do Hospital Albert Einstein.

Recusa: () Temporária () Definitiva Motivo: _____ Prazo: () dias.

Declaro que:

- Li o folheto "Informações sobre a Doação de Sangue ou Aférese (BA.TEC.498)".
- Entendi as questões acima formuladas e afirmo que as informações por mim prestadas são verdadeiras
- Estou ciente do motivo da inaptidão e tive a oportunidade de esclarecer minhas dúvidas a respeito.

Assinatura do Doador

Responsável pela triagem: _____ / /

Conferido triagem por: _____ / /

Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação no estudo

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta de material biológico

Título da pesquisa: AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE VIREMIA POR ZIKA VÍRUS EM DOADORES DE SANGUE.

DOADORES DE SANGUE com idade \geq 18 anos

Você está sendo convidado (a) a participar como voluntário (a) no estudo sobre

“AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE VIREMIA POR ZIKA VIRUS EM DOADORES DE SANGUE”

O objetivo geral deste estudo é estimar a prevalência (número de casos) da infecção por ZIKA VÍRUS (ZIKV) em doadores de sangue do Hospital Israelita Albert Einstein.

O risco de transmissão do ZIKV através da transfusão de sangue ainda não está estabelecido. O conhecimento do número de doadores que podem ter o vírus no momento da doação poderá auxiliar na avaliação deste risco e na tomada de decisões preventivas.

Amostras de seu sangue são de interesse para a realização deste estudo, sem que isso afete em nada o resultado de seus exames e da sua doação. Assim sendo, se o (a) senhor (a) aceitar conceder o uso de suas amostras de sangue, deverá assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Se o (a) senhor (a) tiver qualquer pergunta, por favor, entrar em contato com o profissional responsável pela condução do estudo para que possa esclarecer suas dúvidas. A decisão de fazer parte do estudo é voluntária e o (a) senhor (a) pode recusar ou retirar-se do estudo a qualquer momento sem nenhum tipo de consequência.

Informamos também que, caso seja necessário, suas informações clínicas serão consultadas no sistema pelos pesquisadores envolvidos. Essas informações, assim como os resultados obtidos nas pesquisas realizadas poderão ser utilizadas no estudo. O pesquisador principal e sua equipe garantem o sigilo e a confidencialidade das suas informações, ressaltando que os dados do participante permanecerão anônimos.

Procedimentos realizados neste protocolo para exames laboratoriais

Para este estudo será coletado, uma amostra adicional de 10 ml de sangue. Esta amostra adicional será obtida no momento da doação através da mesma punção venosa.

A Amostra será submetida a um teste de laboratório que pode detectar a presença ou ausência do material genético do vírus Zika no sangue.

Por se tratar de um teste recente e não comercialmente disponível, não está estabelecido em que porcentagem ocorrem resultados falsos positivos ou falsos negativos. Portanto os resultados obtidos não são garantia de diagnóstico.

Caso o resultado obtido na análise da sua amostra seja positivo o senhor (a) será informado via telefone e convidado a comparecer ao serviço. Nesta ocasião receberá o resultado impresso e será orientado a procurar um serviço médico de sua escolha e confiança para

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta de material biológico

Título da pesquisa: AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE VIREMIA POR ZIKA VÍRUS EM DOADORES DE SANGUE.

acompanhamento. Caso esteja de acordo, será coletada uma nova amostra a fim de avaliarmos se o teste ainda está positivo. Testes negativos não serão comunicados.

Em algumas situações especiais, as amostras coletadas poderão não ser analisadas e neste caso o senhor também não será notificado.

RISCOS:

Este procedimento não traz riscos adicionais aos da doação de sangue.

BENEFÍCIOS:

Esta pesquisa contribuirá para o conhecimento do número de doadores assintomáticos que podem ter o vírus circulando no momento da doação e conseqüentemente na tomada de decisões preventivas.

Confidencialidade

Para garantir a proteção de sua identidade, os pesquisadores o identificarão através de um código numérico. Seu nome nunca será mencionado em qualquer relatório ou publicação que possam resultar deste estudo. Sua identidade será mantida em confidencialidade e sigilo pelos pesquisadores do estudo e sua equipe de acordo com as leis, resoluções e códigos de conduta profissional aplicáveis no Brasil.

Ao assinar este TCLE o (a) senhor(a) está permitindo que suas informações médicas relacionadas ao estudo sejam verificadas, registradas em um banco de dados, analisadas e compartilhadas somente por pessoas autorizadas para conduzir e monitorar este estudo durante e após a finalização desta pesquisa. Os dados do estudo poderão ser utilizados em publicações médicas para finalidade científica sem que seu nome seja revelado. Os dados obtidos serão tratados sob estrita condição de confidencialidade. Em caso de encontrarmos alterações no resultado de seus exames o senhor (a) poderá ser informado (a) ou não, conforme sua opção.

Sua participação neste projeto é totalmente voluntária e não haverá remuneração pessoal ou institucional. Seu consentimento pode ser retirado a qualquer momento pelo (a) senhor (a), sem precisar justificar e sem sofrer qualquer prejuízo.

Informações Adicionais e Contatos em caso de dúvidas.

Em qualquer etapa do estudo, o (a) senhor (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Médicos responsáveis pela condução desse estudo:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta de material biológico

Título da pesquisa: AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE VIREMIA POR ZIKA VÍRUS EM DOADORES DE SANGUE.

Dra. Claudia C. Naufel Terzian, no telefone: 2151 0444

Dr. José Mauro Kutner pelo telefone 2151 0444.

Se o (a) senhor (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o CEP - Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein – Av. Albert Einstein, 627/701 – 2º Subsolo – Bloco: A - Tel. 11 2151-3729, FAX: 11 215 – e-mail: cep@einstein.br.

O CEP é um grupo formado de cientistas e não-cientistas que realizam a revisão ética inicial e contínua do estudo clínico para manter sua segurança e proteger seus direitos.

Assinaturas de Consentimento

Fui informado de todos os detalhes relacionados ao estudo ao qual serei submetido. Entendo que sou livre para aceitar ou recusar a participar e que posso retirar-me do estudo em qualquer ocasião, sem nenhuma consequência para a continuação da minha doação. Concordo que os dados coletados para o estudo serão usados para os fins descritivos acima, e que serão mantidos sob sigilo e confidencialidade e entendo também que o material coletado poderá ser doado para pesquisa básica e não será utilizado em seres humanos.

Ao assinar este termo de consentimento não estarei abrindo mão de meus direitos legais.

Li e entendi as informações apresentadas neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Pude fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas.

DADOS DO PARTICIPANTE

Nome: _____ Data nascimento.: ____/____/____

Endereço: _____ Compl: _____

Bairro: _____ CEP: _____ Cidade: _____ Estado: ____

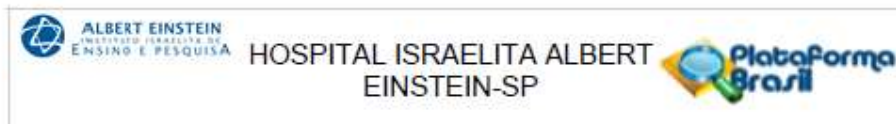
Assinatura: _____ **Data:** _____

DADOS DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Nome: _____ Data nascimento.: ____/____/____

Endereço: _____ Compl: _____

Anexo D -Comprovantes de aprovação do projeto nos comitês de ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE VIREMIA POR ZIKA VIRUS EM DOADORES DE SANGUE

Pesquisador: José Mauro

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 54137318.7.0000.0071

Instituição Proponente: Hospital Israelita Albert Einstein-SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.464.872

Apresentação do Projeto:

: Zika Virus (ZIKV) é um flavivirus cuja presença foi detectada pela primeira vez no Brasil em 2015. Inicialmente, foi considerado como mais uma arbovirose, porém de menor patogenicidade quando comparada à Dengue e a Chikungunya. No entanto, uma associação da infecção de gestantes por este agente e microcefalia em seus fetos tornou o ZIKV objeto de grande preocupação e interesse da comunidade científica internacional. Não se conhece o potencial de transmissão transfusional do ZIKV e não há descrição de casos na literatura médica especializada. No período de março de 2016 a fevereiro de 2017 uma amostra de pelo menos 4452 doadores de sangue do Hospital Israelita Albert Einstein será testada para verificação de viremia por ZIKV. Por não existir teste molecular disponível comercialmente, utilizaremos um teste RT-PCR específico para o ZIKV baseado na metodologia descrita na literatura médica.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a prevalência de viremia por ZIKV em doadores de sangue do Hospital Israelita Albert Einstein.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Benefícios: Padronizar um teste de RT-PCR para detecção de ZIKV em doadores de sangue; Triar a bolsa doada para presença de ZIKV, evitando assim a transfusão de sangue contaminado; Delimitar

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss
 Bairro: Morumbi CEP: 05.652-000
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2151-3729 Fax: (11)2151-0273 E-mail: cep@einstein.br



Continuação do Parecer: 1.464.872

a epidemiologia de infecção pelo ZIKV em doadores de sangue de um hospita privado em São Paulo, Capital.

Riscos: Mínimos. O exame será feito em amostra de sangue que será doado de livre e espontânea vontade pelos doadores para propósito assistencial. O estudo não traz riscos adicionais ao processo de doação de sangue.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa muito bem escrita e elaborada, de grande relevância para a saúde pública do Brasil nesse momento em que o País vive uma epidemia de infecção por ZIKV.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos estão presentes. TCLE redigido de forma clara e em linguagem adequada. Todos os campos do TCLE estão corretos.

Recomendações:

É atribuição do CEP "acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa". Por isso o/a pesquisador/a responsável deverá encaminhar para o CEP Einstein os Relatórios Parciais a cada seis meses e o Relatório Final de seu projeto, até 30 dias após o seu término.

Segundo a Resolução CNS 466/2012 o pesquisador responsável deve prever procedimentos que assegurem a confidencialidade e a privacidade, a proteção da imagem e a não estigmatização dos participantes da pesquisa, garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, inclusive em termos de autoestima, de prestígio e/ou de aspectos econômico-financeiros.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

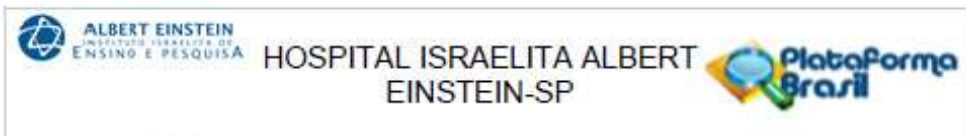
Após avaliação, os seguintes documentos foram Aprovados:

- 1-Projeto de Pesquisa - Versão 1 datada de 24 de Março de 2016;
- 2-Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Versão 1 datada de 14 de Março de 2016.

Considerações Finais a critério do CEP:

PROJETO ANALISADA E APROVADO PELO CEP DO HOSPITAL ISRAELITA ALBERT EINSTEIN EM REUNIÃO

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss
 Bairro: Morumbi CEP: 05.652-000
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2151-3729 Fax: (11)2151-0273 E-mail: cep@einstein.br



Continuação do Parecer: 1.464.872

REALIZADA EM 22/03/2016.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_874022.pdf	14/03/2016 14:46:44		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Responsabilidade.pdf	14/03/2016 14:46:25	José Mauro	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	14/03/2016 14:43:31	José Mauro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEZika.docx	14/03/2016 14:42:01	José Mauro	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.docx	04/03/2016 15:53:23	José Mauro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	NATPARAZIKAVIRUSNOBSHIAE.docx	04/03/2016 15:50:44	José Mauro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 24 de Março de 2016

Assinado por:
Fabio Pires de Souza Santos
(Coordenador)

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 266
 Bairro: Monumbi CEP: 05.652-000
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2151-3729 Fax: (11)2151-0273 E-mail: cep@einstein.br

ANEXO E - Artigo publicado durante o período do mestrado

DISPATCHES

External Quality Assessment for Zika Virus Molecular Diagnostic Testing, Brazil

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

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

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

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

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

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

The Study

Fifteen laboratories from 7 Brazilian states participated in this study; these laboratories are spread across ≈2,500 km longitude, including the areas most affected during Brazil's Zika virus outbreak (1). Participants were university laboratories, hospital laboratories, federal research institutes supporting public health services, and a diagnostic testing company. We provided EQA panels to all laboratories. Each panel comprised 12 lyophilized samples containing inactivated full virus spiked into human plasma tested negative for arboviruses beforehand. The panel consisted of 4 Zika virus-positive specimens of 10⁵–10⁶ RNA copies/mL to assess sensitivity and determine viral load. Zika virus-negative specimens to assess specificity comprised dengue virus serotypes 2 and 4, Japanese encephalitis

ANEXO F - Trabalhos apresentados em congressos durante o período do mestrado

Nucleic acid testing of blood donors for Zika Virus

Lira SMC¹, Bub CB¹, Altman SPN¹, Farinha MLT¹, Bringer KFT¹, Aravechia MQ¹, Sakashita AM¹, Levi JE¹, J M Kutner¹

¹ Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brazil.



Objectives:

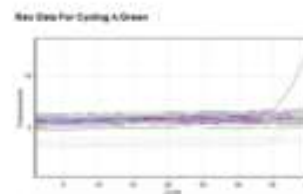
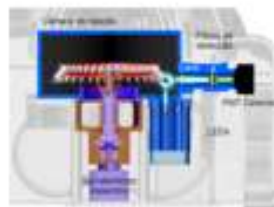
In countries experiencing outbreaks of arboviruses, asymptomatic carriers may candidate as blood donors, ultimately leading the transfusional transmission (TT) of the agent a plausible possibility. In a French Polynesia study, 3% of donors were positive and only 0.7% reported symptoms. As the clinical outcome of TT Zika is unpredictable, NAT screening has been proposed to mitigate the risk. The aim of this study was to develop, validate and implement an "in-house" method to detect Zika RNA in blood donations, further incorporating it into the routine.

Design/Methods:

Primary plasma tubes from donors providing an informed consent are submitted to nucleic acid extraction using magnetic particles chemistry technology on automated platform. After extraction, NAT set-up is performed in the robotic pipettor, where an amplification mixture containing primers and probes for Zika and an internal control in duplex are added. Real-Time polymerase chain reaction is then performed. One run consists of up to 70 donations and the whole process takes from 4-6 hours. A commercially available quantified Zika RNA was used to estimate the assay limit of detection and determine the viral load on a cell culture supernatant (CCS).

Results:

A negative plasma spiked with Zika virus from CCS at a final concentration of 13 copies/mL is used as a running control. From May 23rd 2016 to July 28th 2017, 2600 samples were tested, 5 (1.1%) were considered invalid due to internal control failure and were repeated and released on the next day. Standard deviations of Ct values from Zika positive control (N= 20, Mean Ct = 30.8, SD Ct = 0.94) and the internal control (N= 471, Mean Ct = 28.0, SD Ct= 1.37) are low, reflecting the reproducibility of the method. No Zika RNA reactive sample was identified.



Discussion: It was possible to determine the laboratory characteristics of the developed method and the test showed feasible to be incorporated to the blood screening routine.

Conclusion: Studies are still necessary to identify the real risk of ZIKA TT disease. This method represents an alternative to warrant the safety of the blood supply against the emerging Zika virus epidemics. Until now, none of Zika RNA+ donation was detected in our screening blood donors routine.



ALBERT EINSTEIN
HOSPITAL ISRAELITA
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES

NUCLEIC ACID TESTING OF BLOOD DONORS FOR ZIKA VIRUS

S. Lira¹, C. Sab¹, S. Altman¹, M. Falcão¹, K. Brigger¹, M. Azevedo¹, A. Sakashita¹, J. Levi¹, J. Estrela¹
¹Blood Bank, Hospital Albert Einstein, São Paulo, Brazil
¹Hospital Israelita Albert Einstein

Background: In countries experiencing outbreaks of arboviruses, asymptomatic carriers may candidate as blood donors, ultimately leading the transfusional transmission (TT) of the agent a plausible possibility. In a French Polynesia study, 3% of donors were positive for Zika RNA and only 0.7% reported symptoms. As the clinical outcome of TT Zika is unpredictable, NAT screening has been proposed to mitigate the risk.

Aims: The aim of this study was to develop, validate and implement an "in-house" method to detect Zika RNA in blood donations further incorporating it into the routine.

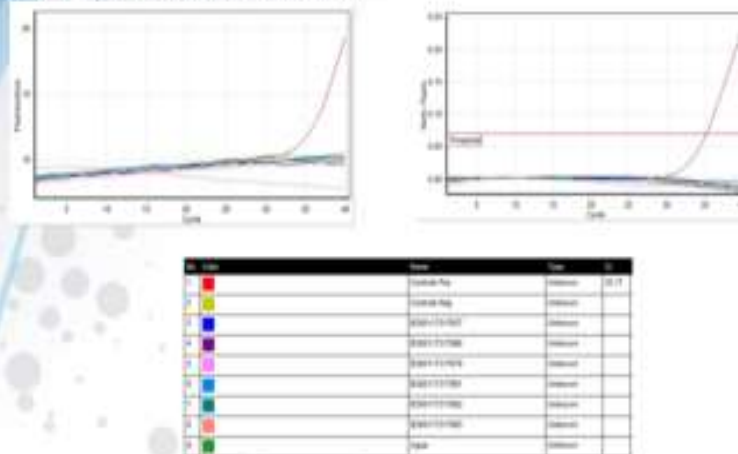
Methods: Primary plasma tubes from donors providing an informed consent are submitted to nucleic acid extraction using magnetic particles chemistry technology on an automated platform. After extraction, NAT set-up is performed in the robotic pipettor, where an amplification mixture containing primers and probes for Zika and an internal control in duplex are added. Real-Time polymerase chain reaction is then performed. One run consists of up to 70 donations and the whole process takes from 4-6 hours. A commercially available quantitated Zika RNA was used to estimate the assay limit of detection and determine the viral load on a cell culture supernatant (CCS).

Results: A negative plasma spiked with Zika virus from CCS at a final concentration of 13 copies/mL is used as a running control. From May 23rd 2016 to May 25th 2017, 2110 samples were tested; 17 (0.80%) were considered invalid due to internal control failure and were repeated and released on the next day. Standard deviations of Ct values from Zika positive control (N= 28, Mean Ct = 30.8; SD Ct = 0.94) and the internal control (N= 471, Mean Ct = 28.0; SD Ct= 1.37) are low, reflecting the reproducibility of the method (Figure 1).

The ZIKA RNA standard established by WHO/Paul-Erich Institute was employed for the determination of the sensitivity of the method. Probit analysis determined an LOD 95%= 152 IU/mL (IC 95% 120-230 IU/mL).

No Zika RNA reactive sample was identified.

Figure 1 – Standard Ct values from Zika positive control



10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dick GWA, Kitchen SF, Haddow AJ. ZIKA VIRUS .1. ISOLATIONS AND SEROLOGICAL SPECIFICITY. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1952;46(5):509-20.
2. Dick GWA. ZIKA VIRUS .2. PATHOGENICITY AND PHYSICAL PROPERTIES. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1952;46(5):521-34.
3. Macnamara FN. ZIKA VIRUS - A REPORT ON 3 CASES OF HUMAN INFECTION DURING AN EPIDEMIC OF JAUNDICE IN NIGERIA. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1954;48(2):139-45.
4. Fagbami AH. ZIKA VIRUS-INFECTIONS IN NIGERIA - VIROLOGICAL AND SEROEPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATIONS IN OYO STATE. Journal of Hygiene. 1979;83(2):213-9.
5. Moore DL, Causey OR, Carey DE, Reddy S, Cooke AR, Akinkugbe FM, et al. ARTHROPOD-BORNE VIRAL-INFECTIONS OF MAN IN NIGERIA, 1964-1970. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 1975;69(1):49-64.
6. Monlun E, Zeller H, Leguenno B, Traorelamizana M, Hervy JP, Adam F, et al. ARBOVIRUS AFFECTING HUMANS IN SOUTHEASTERN SENEGAL - SURVEILLANCE IN HUMANS AND MOSQUITOS (1988-1991). Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique. 1993;86(1):21-8.
7. Olson JG, Ksiazek TG, Suhandiman, Triwibowo. ZIKA VIRUS, A CAUSE OF FEVER IN CENTRAL JAVA, INDONESIA. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1981;75(3):389-93.
8. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. New England Journal of Medicine. 2009;360(24):2536-43.
9. Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, et al. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. Emerging Infectious Diseases. 2014;20(6):1085-6.
10. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastere S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. Lancet. 2016;387(10027):1531-9.
11. Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. Clinical Microbiology and Infection. 2014;20(10):O595-O6.
12. Zanluca C, de Melo VCA, Mosimann ALP, dos Santos GIV, dos Santos CND, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz. 2015;110(4):569-72.
13. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. Emerging Infectious Diseases. 2015;21(10):1885-6.
14. Hennessey M, Fischer M, Staples JE. Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. Mmwr-Morbidity and Mortality Weekly Report. 2016;65(3):55-8.
15. Salvador FS, Fujita DM. Entry routes for Zika virus in Brazil after 2014 world cup: New possibilities. Travel Medicine and Infectious Disease. 2016;14(1):49-51.
16. Musso D. Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. Emerging Infectious Diseases. 2015;21(10):1887-.
17. Camacho E, Paternina-Gomez M, Blanco PJ, Osorio JE, Aliota MT. Detection of Autochthonous Zika Virus Transmission in Sincelejo, Colombia. Emerging Infectious Diseases. 2016;22(5):927-9.
18. Zika virus update: Guatemala, Mexico ex Colombia: ProMED-mail. <http://www.promedmail.org>.; 25 November 2015 [
19. Zika virus—Americas, Atlantic Ocean ProMED-mail. 23 December 2015. <http://www.promedmail.org>. [
20. Zika virus America ProMED-mail. <http://www.promedmail.org.31> December 2015 [

21. McCarthy M. First US case of Zika virus infection is identified in Texas. *Bmj-British Medical Journal*. 2016;352.
22. Tappe D, Rissland J, Gabriel M, Emmerich P, Guenther S, Held G, et al. First case of laboratory-confirmed Zika virus infection imported into Europe, November 2013. *Eurosurveillance*. 2014;19(4):12-5.
23. Zammarchi L, Stella G, Mantella A, Bartolozzi D, Tappe D, Gunther S, et al. Zika virus infections imported to Italy: Clinical, immunological and virological findings, and public health implications. *Journal of Clinical Virology*. 2015;63:32-5.
24. Collantes F, Delacour S, Alarcon-Elbal PM, Ruiz-Arrondo I, Delgado JA, Torrell-Sorio A, et al. Review of ten-years presence of *Aedes albopictus* in Spain 2004-2014: known distribution and public health concerns. *Parasites & Vectors*. 2015;8.
25. Fonseca K, Meatherall B, Zarra D, Drebot M, MacDonald J, Pabbaraju K, et al. Case Report: First Case of Zika Virus Infection in a Returning Canadian Traveler. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2014;91(5):1035-8.
26. Chu DT, Ngoc VTN, Tao Y. Zika virus infection in Vietnam: current epidemic, strain origin, spreading risk, and perspective. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2017;36(11):2041-2.
27. Ho ZJM, Hapuarachchi HC, Barkham T, Chow LPA, Ng LC, Lee JMV, et al. Outbreak of Zika virus infection in Singapore: an epidemiological, entomological, virological, and clinical analysis. *Lancet Infectious Diseases*. 2017;17(8):813-21.
28. Organization WH. Zika epidemiology update. 2019.
29. Singh RK, Dhama K, Malik YS, Ramakrishnan MA, Karthik K, Tiwari R, et al. Zika virus - emergence, evolution, pathology, diagnosis, and control: current global scenario and future perspectives - a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*. 2016;36(3):150-75.
30. Kuno G, Chang GJJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Archives of Virology*. 2007;152(4):687-96.
31. Wang L, Valderramos SG, Wu AP, Ouyang SY, Li CF, Brasil P, et al. From Mosquitos to Humans: Genetic Evolution of Zika Virus. *Cell Host & Microbe*. 2016;19(5):561-5.
32. Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika Virus. *New England Journal of Medicine*. 2016;374(16):1552-63.
33. Kuno G, Chang GJJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *Journal of Virology*. 1998;72(1):73-83.
34. Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Archives of Medical Research*. 2002;33(4):330-42.
35. Davidson A, Slavinski S, Komoto K, Rakeman J, Weiss D. Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus - New York City, 2016. *Mmwr-Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2016;65(28):716-7.
36. McCarthy M. Zika virus was transmitted by sexual contact in Texas, health officials report. *Bmj-British Medical Journal*. 2016;352.
37. Foy BD, Kobylinski KC, Foy JLC, Blitvich BJ, da Rosa AT, Haddock AD, et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerging Infectious Diseases*. 2011;17(5):880-2.
38. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau V. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases*. 2015;21(2):359-61.
39. Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau VM, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance*. 2014;19(13):13-6.
40. Gregory CJ, Oduyebo T, Brault AC, Brooks JT, Chung KW, Hills S, et al. Modes of Transmission of Zika Virus. *J Infect Dis*. 2017;216(suppl_10):S875-S83.
41. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clinical Microbiology Reviews*. 2016;29(3):487-524.

42. Cao-Lormeau VM, Musso D. Emerging arboviruses in the Pacific. *Lancet*. 2014;384(9954):1571-2.
43. Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IML, Horovitz DDG, Cavalcanti DP, Pessoa A, et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. *Mmwr-Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2016;65(3):59-62.
44. Gulland A. Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. *Bmj-British Medical Journal*. 2016;352.
45. Petersen LR, Busch MP. Transfusion-transmitted arboviruses. *Vox Sanguinis*. 2010;98(4):495-503.
46. Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Eurosurveillance*. 2014;19(14):6-8.
47. Gallian P, Cabie A, Richard P, Patrel L, Charrel RN, Pastorino B, et al. Zika virus in asymptomatic blood donors in Martinique. *Blood*. 2017;129(2):263-6.
48. Kuehnert MJ, Basavaraju SV, Moseley RR, Pate LL, Galel SA, Williamson PC, et al. Screening of Blood Donations for Zika Virus Infection - Puerto Rico, April 3-June 11, 2016. *Mmwr-Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2016;65(24):627-8.
49. Williamson PC, Linnen JM, Kessler DA, Shaz BH, Kamel H, Vassallo RR, et al. First cases of Zika virus-infected US blood donors outside states with areas of active transmission. *Transfusion*. 2017;57(3):770-8.
50. Galel SA, Williamson PC, Busch MP, Stanek D, Bakkour S, Stone M, et al. First Zika-positive donations in the continental United States. *Transfusion*. 2017;57(3):762-9.
51. Slavov SN, Hespanhol MR, Rodrigues ES, Levi JE, Ubiali EMA, Covas DT, 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;57(12):2897-901.
52. Barjas-Castro ML, Angerami RN, Cunha MS, Suzuki A, Nogueira JS, Rocco IM, et al. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. *Transfusion*. 2016;56(7):1684-8.
53. Motta IJF, Spencer BR, Ferreira OC. Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(11):1101-3.
54. Bierlaire D, Manguin S, Broult J, Musso D. Zika virus and blood transfusion: the experience of French Polynesia. *Transfusion*. 2017;57(3):729-33.
55. Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, Lanciotti RS, Page PL, Stramer SL, et al. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(13):1236-45.
56. Liunbruno GM, Calteri D, Petropulacos K, Mattivi A, Po C, Macini P, et al. The Chikungunya epidemic in Italy and its repercussion on the blood system. *Blood Transfusion*. 2008;6(4):199-210.
57. Jimenez A, Shaz BH, Bloch EM. Zika Virus and the Blood Supply: What Do We Know? *Transfusion Medicine Reviews*. 2017;31(1):1-10.
58. US Food and Drug Administration. FDA Guidance: recommendations for donor screening, deferral, and product management to reduce the risk of transfusion-transmission of Zika virus. [Internet]: Food and Drug Administration 2016 [
59. US Food and Drug Administration. Revised recommendations for reducing the risk of Zika virus transmission by blood and blood components US Food and Drug Administration. [Internet]2016 [
60. US Food and Drug Administration, Revised recommendations for reducing the risk of Zika virus transmission by blood and blood components July 2018. In: Administration FaD, editor. 2018.
61. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica Conjunta ANVISA/SAS/MS n002/2016. 2016 [

62. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica Nº 5/2020-CGSH/DAET/SAES/MS. [
63. Yonemura S, Doane S, Keil S, Goodrich R, Pidcoke H, Cardoso M. Improving the safety of whole blood-derived transfusion products with a riboflavin-based pathogen reduction technology. *Blood Transfusion*. 2017;15(4):357-64.
64. Seltsam A. Pathogen Inactivation of Cellular Blood Products-An Additional Safety Layer in Transfusion Medicine. *Frontiers in Medicine*. 2017;4.
65. Irsch J, Lin L. Pathogen Inactivation of Platelet and Plasma Blood Components for Transfusion Using the INTERCEPT Blood System (TM). *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2011;38(1):19-31.
66. Musso D, Richard V, Brout J, Cao-Lormeau V-M. Inactivation of dengue virus in plasma with amotosalen and ultraviolet A illumination. *Transfusion*. 2014;54(11):2924-30.
67. Rasongles P, Isola H, Kientz D, Cazenave JP, Sawyer L, Corash L. Rapid implementation of photochemical pathogen inactivation (intercept) for preparation of platelet components during an epidemic of Chikungunya virus. *Vox Sanguinis*. 2006;91:32-.
68. Aubry M, Richard V, Green J, Brout J, Musso D. Inactivation of Zika virus in plasma with amotosalen and ultraviolet A illumination. *Transfusion*. 2016;56(1):33-40.
69. Marschner S, Goodrich R. Pathogen Reduction Technology Treatment of Platelets, Plasma and Whole Blood Using Riboflavin and UV Light. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2011;38(1):8-18.
70. Seltsam A, Muller TH. UVC Irradiation for Pathogen Reduction of Platelet Concentrates and Plasma. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2011;38(1):43-54.
71. Aubry M, Finke J, Teissier A, Roche C, Brout J, Paulous S, et al. Seroprevalence of arboviruses among blood donors in French Polynesia, 2011-2013. *International Journal of Infectious Diseases*. 2015;41:11-+.
72. Charrel RN, Leparç-Goffart I, Pas S, de Lamballerie X, Koopmans M, Reusken C. Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. *Bulletin of the World Health Organization*. 2016;94(8):574-84.
73. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, et al. ANTIGENIC RELATIONSHIPS BETWEEN FLAVIVIRUSES AS DETERMINED BY CROSS-NEUTRALIZATION TESTS WITH POLYCLONAL ANTISERA. *Journal of General Virology*. 1989;70:37-43.
74. Maeda A, Maeda J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *Veterinary Journal*. 2013;195(1):33-40.
75. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases*. 2008;14(8):1232-9.
76. Waehre T, Maagard A, Tappe D, Cadar D, Schmidt-Chanasit J. Zika Virus Infection after Travel to Tahiti, December 2013. *Emerging Infectious Diseases*. 2014;20(8):1412-4.
77. Dodd RY, Foster GA, Stramer SL. Keeping Blood Transfusion Safe From West Nile Virus: American Red Cross Experience, 2003 to 2012. *Transfusion Medicine Reviews*. 2015;29(3):153-61.
78. Saa P, Proctor M, Foster G, Kryzstof D, Winton C, Linnen JM, et al. Investigational Testing for Zika Virus among US Blood Donors. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(19):1778-88.
79. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria Nº 158, de 04 de fevereiro de 2016. DOU de 05/02/2016 (nº 25, Seção 1, pág. 37).
80. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação Nº 5, de 28 de setembro de 2017. DOU nº 190 - Suplemento de 03 de Outubro de 2017,.
81. Saúde BMD. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2015. Ministério da Saúde; 2016.

- 82.Saúde. BMD. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. Ministério da Saúde. 2017.
- 83.Saúde BMD. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018.: Ministério da Saúde; Ministério da Saúde. 2019.
- 84.Fischer C, Pedrosa C, Mendrone A, de Filippis AMB, Vallinoto ACR, Ribeiro BM, et al. External Quality Assessment for Zika Virus Molecular Diagnostic Testing, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2018;24(5):888-92.
- 85.Basile AJ, Ao JN, Horiuchi K, Semenova V, Steward-Clark E, Schiffer J. Performance of InBios ZIKV Detect (TM) 2.0 IgM Capture ELISA in two reference laboratories compared to the original ZIKV Detect (TM) IgM Capture ELISA. *Journal of Virological Methods*. 2019;271.
- 86.Tsai WY, Youn HH, Brites C, Tsai JJ, Tyson J, Pedrosa C, et al. Distinguishing Secondary Dengue Virus Infection From Zika Virus Infection With Previous Dengue by a Combination of 3 Simple Serological Tests. *Clinical Infectious Diseases*. 2017;65(11):1829-36.
- 87.Kraemer MUG, Reiner RC, Brady O, Messina JP, Gilbert M, Pigott DM, et al. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nature Microbiology*. 2019;4(5):854-63.
- 88.Pisani G, Cristiano K, Pupella S, Liembruno GM. West Nile Virus in Europe and Safety of Blood Transfusion. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2016;43(3):158-67.
- 89.Pupella S, Pisani G, Cristiano K, Catalano L, Grazzini G. West Nile virus in the transfusion setting with a special focus on Italian preventive measures adopted in 2008-2012 and their impact on blood safety. *Blood Transfusion*. 2013;11(4):563-74.
- 90.Rasongles P, Angelini-Tibert MF, Simon P, Currie C, Isola H, Kientz D, et al. Transfusion of platelet components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment during a Chikungunya virus epidemic in Ile de La Reunion. *Transfusion*. 2009;49(6):1083-91.
- 91.Slavov SN, Gonzaga FAC, Pimentel BMS, Ramos D, de Araujo WN, Covas DT, et al. Zika virus RNA surveillance in blood donors in the Federal District of Brazil during the 2016 outbreak. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2019.
- 92.Diefenbach CF SS, Kashima S, Ferreira AR, Hespanhol, MR BB, et al. Prevalence of Zika Virus (Zikv) in blood donors from a hemotherapy service of the southern region of Brazil. . *ISBT Sci Series* 2018 0 1–6.
- 93.Benites BD, Rocha D, Andrade E, Godoy DT, Alvarez P, Addas-Carvalho M. Zika Virus and the Safety of Blood Supply in Brazil: A Retrospective Epidemiological Evaluation. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2019;100(1):174-7.
- 94.Basile K, Kok J, Dwyer DE. Zika virus: what, where from and where to? *Pathology*. 2017;49(7):698-706.
- 95.Biggerstaff BJ, Petersen LR. Estimated risk of West Nile virus transmission through blood transfusion during an epidemic in Queens, New York City. *Transfusion*. 2002;42(8):1019-26.
- 96.Biggerstaff BJ, Petersen LR. Estimated risk of transmission of the West Nile virus through blood transfusion in the US, 2002. *Transfusion*. 2003;43(8):1007-17.
- 97.Magnus MM, Esposito DLA, Costa VAD, Melo PS, Costa-Lima C, Fonseca B, et al. Risk of Zika virus transmission by blood donations in Brazil. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2018;40(3):250-4.
- 98.Sabino EC, Loureiro P, Lopes ME, Capuani L, McClure C, Chowdhury D, et al. Transfusion-Transmitted Dengue and Associated Clinical Symptoms During the 2012 Epidemic in Brazil. *Journal of Infectious Diseases*. 2016;213(5):694-702.
- 99.Dejnirattisai W, Webb AI, Chan V, Jumnainsong A, Davidson A, Mongkolsapaya J, et al. Lectin Switching During Dengue Virus Infection. *Journal of Infectious Diseases*. 2011;203(12):1775-83.
- 100.Conway MJ, Watson AM, Colpitts TM, Dragovic SM, Li ZY, Wang PH, et al. Mosquito Saliva Serine Protease Enhances Dissemination of Dengue Virus into the Mammalian Host. *Journal of Virology*. 2014;88(1):164-75.

101. Surasombatpattana P, Ekchariyawat P, Hamel R, Patramool S, Thongrungrat S, Denizot M, et al. Aedes aegypti Saliva Contains a Prominent 34-kDa Protein that Strongly Enhances Dengue Virus Replication in Human Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 2014;134(1):281-4.
102. Levi JE, Nishiya A, Felix AC, Salles NA, Sampaio LR, Hangai F, et al. Real-time symptomatic case of transfusion-transmitted dengue. *Transfusion*. 2015;55(5):961-4.
103. Oh HB, Muthu V, Daruwalla ZJ, Lee SY, Koay ES, Tambyah PA. Bitten by a bug or a bag? Transfusion-transmitted dengue: a rare complication in the bleeding surgical patient. *Transfusion*. 2015;55(7):1655-61.