

Marcelo Plaisant Geraldi

Pesquisa sentinela da introdução do vírus do Oeste do Nilo no Brasil pela análise de doadores de sangue do Amazonas e Mato Grosso do Sul

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional  
Orientador: Dr. José Eduardo Levi

São Paulo  
2012

Ficha catalográfica  
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da  
Universidade de São Paulo  
© Reprodução autorizada pelo autor

Geraldi, Marcelo Plaisant

Pesquisa sentinela da introdução do vírus do Oeste do Nilo pela análise de doadores de sangue do Amazonas e Mato Grosso do Sul / Marcelo Plaisant Geraldi. – São Paulo, 2012.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional  
Orientador: José Eduardo Levi

Descritores: 1. VÍRUS DO OESTE DO NILO. 2. REAÇÃO EM CADEIA POR POLIMERASE (PCR). 3. DOAÇÃO (SANGUE). 4. EQUINOS. 5. FLAVIVIRUS.

**USP/IMTSP/BIB-05/2012.**

## AGRADECIMENTOS

Aos funcionários do Centro de Imunologia e Imunogenética – Sírio Libanês, pela compreensão, paciência, carinho e ajuda.

A Lai Yen Ling, minha noiva, agradeço por tudo, nesses 4 anos de carinho, amor e companheirismo.

Aos meus amigos e todos os membros do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical, pelos ótimos momentos.

Ao Dudi, meu orientador, amigo e cunhado, pela supervisão, conhecimento, feedbacks construtivos e boas conversas.

A Renata, minha irmã, por toda hospitalidade, amizade e disposição em ajudar durante meu período em São Paulo.

A minha mãe, Carmen Plaisant, pelo amor, carinho, compreensão, todo o apoio e educação necessária para na minha formação como ser humano mesmo às vezes a distancia.

A toda a minha família por amor e carinho.

À Roche, pelo apoio em relação aos kits utilizados para a realização deste trabalho.

Ao Hemoam e Hemosul, pelo trabalho de coleta das amostras.

À Tatiana Ometto, por ceder amostras de soro e de biopsias cerebrais de equinos, além da ajuda no processamento destas amostras.

Ao Dr. Hélio Gomes pelas amostras de LCR.

“A vida é como andar de bicicleta, para ter equilíbrio você tem que se  
manter em movimento”

**Albert Einstein**

## RESUMO

Geraldi MP. Pesquisa sentinela da introdução do vírus do Oeste do Nilo no Brasil pela análise de doadores de sangue do Amazonas e Mato Grosso do Sul [dissertação]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2012.

O vírus do Oeste do Nilo (VON) é um Flavivírus capaz de infectar muitas espécies de vertebrados, incluindo o homem. Embora reconhecida desde 1940, esta virose nunca havia sido descrita nas Américas, onde emergiu nos Estados Unidos ao final da década de 1990, com numerosos casos de meningoencefalite em humanos. Posteriormente, sua transmissão por transfusão de sangue e órgãos foi comprovada, levando à implantação de testes moleculares (NAT) para a triagem de doadores nos EUA e Canadá a partir de 2003. Nos anos seguintes, o VON foi sendo progressivamente detectado em países como México, Panamá e áreas do Caribe, sugerindo sua iminente introdução na América do Sul. De fato, evidências sorológicas foram reveladas em cavalos e aves na Colômbia, Venezuela, Argentina e muito recentemente no pantanal mato-grossense (em cavalos). A vigilância epidemiológica para este agente é de grande importância para a saúde pública, visto o potencial de morbimortalidade deste vírus para humanos. Sendo assim este trabalho tem o objetivo de investigar a presença do RNA do VON em amostras de doadores de sangue, pacientes com meningoencefalite ou febre de origem indeterminada e soros e amostras cerebrais de equinos. Foram analisadas 2.202 doações de sangue do Amazonas (HEMOAM), 3.144 do Mato Grosso do Sul (HEMOSUL); líquido cefalorraquidiano de 51 pacientes com suspeita de meningoencefalite viral (Hospital das Clínicas/FMUSP, São Paulo) e soro de 198 pacientes com síndrome febril aguda, negativos para Dengue e Malária (Fundação de Medicina Tropical de Manaus). Além disto, 293 amostras de soros de equinos da região do Pantanal e 63 biópsias de tecido cerebral de cavalos que foram a óbito por encefalite de etiologia desconhecida. Estas amostras foram submetidas ao teste automatizado cobas TaqScreen WNV (Roche) na plataforma cobas s201 em sistema de *pool* de 6 unidades (doações de sangue) ou individualmente (pacientes). Todas as amostras apresentaram amplificação satisfatória do controle da reação, porém nenhuma apresentou resultado positivo para a presença do RNA do VON. Embora já exista evidência da exposição de equinos no Brasil ao VON, não parece haver até o momento, disseminação importante deste agente entre humanos e equinos, uma vez que o RNA viral não foi detectado nem em doadores de sangue e nem em equinos, incluindo os de cidades próximas aos locais onde cavalos soropositivos foram encontrados (Corumbá – MS).

Descritores: Vírus do Oeste do Nilo. Reação em Cadeia por Polimerase (PCR). Doação (Sangue). Equinos. Flavivirus.

## ABSTRACT

Geraldi MP. Sentinel survey of the introduction of West Nile virus in Brazil by analyzing blood donors of Amazonas and Mato Grosso do Sul [dissertation]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2012.

The West Nile Virus (WNV) is a Flavivirus able to infect many species of vertebrates, including man. Recognized since 1940, this virus had never been described in the Americas, which emerged in the United States at the end of the 1990s, with numerous cases of meningoencephalitis in humans. Later, transmission by transfusion of blood and organs was confirmed, leading to the deployment of molecular testing (NAT) for screening of donors in the U.S. and Canada since 2003. In the following years, WNV has been progressively detected in countries like Mexico, Panama and the Caribbean areas, suggesting their imminent introduction in South America. In fact, serological evidence was revealed in horses and birds in Colombia, Venezuela and Argentina and most recently in Pantanal, Mato Grosso (horses). Epidemiological surveillance for this agent is of great importance to public health, given the potential morbidity and mortality of this virus to humans. Therefore this study aims to investigate the presence of WNV RNA in samples of blood donors, patients with meningoencephalitis or fever of unknown origin and serum and brain samples from horses.

We analyzed 2202 blood donations from Amazon (HEMOAM), 3144 from Mato Grosso do Sul (HEMOSUL); cerebrospinal fluid of 51 patients with suspected viral encephalitis (Hospital das Clínicas / FMUSP, São Paulo) and serum samples from 198 patients with acute febrile syndrome, negative for Dengue and malaria (Foundation for Tropical Medicine in Manaus). In addition, more 293 serum samples from horses of the Pantanal and 63 biopsies of brain tissue from horses that died of encephalitis of unknown etiology. These samples were subjected to automated cobas TaqScreen WNV test (Roche) on the platform in cobas S201 with a system of 6 units pool (blood donations) or individually (patients). All samples showed satisfactory control amplification, but none showed as positive for the presence of RNA WNV. Although there is already evidence in horses in Brazil of exposure to WNV, there seems to be far that an important spread of this agent between humans and horses, since the viral RNA was not detected either in blood donors or in horses, including cities near the locations where seropositive horses were found (Corumbá - MS).

Descriptors: West Nile virus. Polymerase chain reaction (PCR). Donation (Blood). Flavivirus. Equidae.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Rotas de migração das aves na América do Sul (Luna, EJA 2003) ..... 21
- Figura 2 - Número de doadores de sangue americanos que foram confirmados sendo positivos para o RNA do VON em 2002, 2003, e 2004, de acordo com a semana de coleta (Susan L. Stramer 2005)..... 27

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alguns arbovírus e seus vetores de transmissão. (tabela adaptada de Meltzer, 2012) .....	15
Tabela 2 - Resultado das amostras de doadores de sangue do Estado do Amazonas, provenientes do HEMOAM.....	49
Tabela 3 - Resultado das amostras de doadores de sangue do Estado do Mato Grosso do Sul, provenientes do HEMOSUL. ....	50
Tabela 4 - Resultado das amostras de soros de equinos do Estado do Mato Grosso, Brasil.....	51
Tabela 5 - Resultado das amostras de biópsia cerebrais de equinos. ....	51
Tabela 6 - Resultado das amostras de líquido de pacientes com meningoencefalite de etiologia desconhecida.....	52
Tabela 7 - Resultado dos soros de pacientes com meningoencefalite de etiologia desconhecida de Manaus .....	52



## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
dATP	Desoxiadenosina Trifosfatada
dCTP	Desoxicitidina Trifosfatada
dGTP	DesoxiGuanosina Trifosfatada
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dTTP	Desoxitimidina Trifosfatada
dUTP	Deoxiuridina Trifosfatada
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HEMOAM	Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HEMOSUL	Hemocentro do Mato Grosso do Sul
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IgG	Imunoglobulina M
IgM	Imunoglobulina g
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LD	Limite de detecção
NAT	<i>Nucleic Acid Test</i> - Teste do ácido nucleico
NCR	Região não codificante
NS1	<i>Viral Nonstructural Protein 1</i> - Proteína viral não estrutural 1
NS2A	<i>Viral Nonstructural Protein 2A</i> - Proteína viral não estrutural 2A
NS2B	<i>Viral Nonstructural Protein 2B</i> - Proteína viral não estrutural 2B
NS3	<i>Viral Nonstructural Protein 3</i> - Proteína viral não estrutural 3
NS4A	<i>Viral Nonstructural Protein 4A</i> - Proteína viral não estrutural 4A
NS4B	<i>Viral Nonstructural Protein 4B</i> - Proteína viral não estrutural 4B
NS5	<i>Viral Nonstructural Protein 5</i> - Proteína viral não estrutural 5
ORF	<i>Open Reading Frame</i> - Fase de Leitura Aberta
PCR	Reação da cadeia da polimerase
PFU	Unidades Formadoras de Placa
PRNT	<i>Plaque reduction neutralisation test</i> - teste de neutralização em placa
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase-transcriptase reversa
SNC	Sistema nervoso central
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMA	Transcription Mediated Amplification
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
VON	Vírus do Oeste do Nile
WNV	West Nile Virus

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C            graus Celsius

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	13
1.1. Vírus do Oeste do Nilo .....	13
1.2. Relevância para a Espécie Humana.....	14
1.3. Introdução no Hemisfério Ocidental .....	15
1.4. VON na América do Sul .....	17
1.5. Ecologia.....	19
1.6. Introdução do VON na América Latina - Aves.....	20
1.7. Diagnóstico.....	22
1.8. Detecção em Doadores de Sangue e Órgãos Sólidos .....	25
1.9. Transmissão por Transplante de Órgãos .....	27
1.10. Sazonalidade .....	28
1.11. <i>Flavivirus</i> em doadores de sangue.....	29
2. Justificativa .....	30
3. Materiais e Métodos .....	31
3.1. Desenho do Estudo .....	31
3.2. Amostras Humanas.....	31
3.2.1. Doadores de Sangue.....	31
3.2.2. Líquido Cefalorraquidiano.....	32
3.2.3. Soros de Febre de origem indeterminada .....	32
3.2.4. Amostras de Equinos .....	32
3.3. Critérios de Inclusão.....	33
3.3.1. Doadores de sangue .....	33
3.3.2. Para amostras de líquido.....	33
3.4. Critérios de Exclusão.....	34
3.5. Coleta da Amostra de Doadores de Sangue .....	34
3.6. Sistema automatizado cobas TaqScreen West Nile Virus Test.....	35
3.7. Princípios do Procedimento.....	35
3.8. Reagentes.....	40
3.9. Rotina .....	43
3.10. Controle positivo para verificação do Kit.....	44
3.11. Controles do Kit.....	44
3.12. Controle Negativo.....	45
3.13. Características de desempenho .....	45

3.13.1. Reprodutibilidade.....	45
3.13.2. Sensibilidade Analítica.....	46
3.13.3. Especificidade Analítica.....	47
4. Resultados .....	48
5. Discussão .....	53
6. Conclusão.....	62
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXO A – TCLE HEMOAM / AM.....	70
ANEXO B – TCLE HC / SP.....	71

## 1. Introdução

### 1.1. Vírus do Oeste do Nilo

Este vírus foi inicialmente isolado em 1937 do sangue de uma mulher na região nordeste de Uganda, na margem ocidental do rio Nilo, recebendo assim o nome de "*West Nile Virus*" (WNV), ou Vírus do Oeste do Nilo (VON) (SMITHBURN, K.C, 1940). Novos isolados deste vírus só foram obtidos 10 anos depois, de três crianças egípcias aparentemente saudáveis (MELNICK, J.L., 1951). Após este início vagaroso de observação de novas infecções, centenas de casos foram relatados em humanos, aves e mosquitos em uma vasta área geográfica que incluía a África, Oriente Médio, Europa e Ásia.

Trata-se de um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e ao complexo antigênico da encefalite japonesa (Solomon, 2003). Suas partículas virais são pequenas, com tamanho aproximado de 50 nm de diâmetro, esféricas, além de possuir capsídeo com simetria icosaédrica (Solomon, 2003). O genoma é composto por uma fita de RNA (ácido ribonucleico) positiva de aproximadamente 11.000 bases (Lanciotti, 2000), com um cap 5' tipo 1, m<sup>7</sup>GpppAmpN<sub>2</sub>. Além disto, o genoma dos flavivírus não possui uma cauda de poliadenilato na região 3' e contém uma longa fase de leitura aberta (ORF) que codifica três proteínas estruturais: capsídeo (C),

membrana (M), envelope (E), e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5, que parecem estar envolvidas diretamente ou indiretamente na síntese de RNA viral (Rice, 1996). A ORF é flanqueada por regiões não codificantes (NCR) 5' e 3' com aproximadamente 96 a 100 e 400 a 700 nucleotídeos respectivamente. Estas duas regiões possuem estrutura de "stem-loop" (grampos), os quais influenciam diretamente na replicação viral.

Existem duas linhagens deste vírus, a linhagem I associada à encefalite humana, sendo encontrada na África, Índia, Europa, Ásia e América do Norte e do Sul; e a linhagem II encontrada em focos enzoóticos na África (Petersen, 2001; CDC 1999(a)).

## **1.2. Relevância para a Espécie Humana**

### **Patogenia**

Alguns dos Flavivirus são reconhecidamente causadores de doenças em humanos nas áreas tropicais e subtropicais, como a Dengue, a Febre Amarela, Febre hemorrágica de Omsk e o vírus da encefalite transmitida por carrapatos. Estes agentes etiológicos podem ser transmitidos por vetores artrópodes, como mosquitos e carrapatos (NIH, 2005).

Por ter relação antigênica com outros flavivírus transmitidos por mosquitos, estudos experimentais para determinar o vetor do VON foram realizados logo após a sua descoberta. Estes estudos demonstraram que várias espécies de mosquitos poderiam ser infectadas e transmitir com sucesso esse vírus em laboratório (Kitoaka, M., 1950).

Nas maiores epidemias de VON, que ocorreram após 1996, o *Culex pipiens pipiens* foi verificado como seu principal vetor. Na epidemia da Romênia em 1996, por exemplo, esta foi a espécie de mosquito mais coletada e o único isolado de VON foi feito a partir desta espécie (Savage, H.M. 1999) (Tabela 1).

**Tabela 1 - Alguns arbovírus e seus vetores de transmissão. (tabela adaptada de Meltzer, 2012)**

<b>Arbovírus</b>			
<b>Flavivírus</b>	<b>Bunyaviruses</b>		<b>Reoviruses</b>
Transmissão por mosquito	Transmissão por mosquito	Transmissão por Carrapato	Transmissão por Carrapato
Vírus da Febre Amarela	Vírus da Febre do vale Rift	Vírus da Febre Hemorrágica de Crimeia Congo	Vírus do carrapato do Colorado
Vírus da Dengue Vírus do Oeste do Nilo	Vírus Oropouche Vírus Caraparu		

O período de incubação do VON pode variar de três a quatorze dias. Em geral, esse agente viral poderá causar febre, sinais de meningite asséptica ou encefalite, dores no corpo, *rash* cutâneo e linfadenopatia. Em casos mais severos a febre pode ser mais alta, poderá ocorrer astenia intensa, rigidez de nuca, torpor, desorientação, tremores, convulsões, paralisia, coma e, mais raramente o óbito, principalmente em idosos (Chin, 2000; Nelson, 2001).

### **1.3. Introdução no Hemisfério Ocidental**

Inicialmente o VON apresentava uma distribuição restrita apenas ao vale do Nilo e Oriente Médio. Posteriormente, ocorreram infecções na Ásia (Israel,

Índia, Paquistão, Ilha de Bornéu e países da antiga União Soviética) e África (África do Sul, Egito, Uganda, Congo, Moçambique, República Centro Africana e Nigéria) (Petersen, 2001; Hubalek Z 1999).

Na Europa, a primeira evidência do VON se deu ainda na década de 50, em dois pacientes albaneses com sorologia positiva. Em 1963 o vírus foi isolado de pacientes e mosquitos no delta do Reno, sul da França, e a partir de 1967 foi isolado em Portugal, Itália, Áustria, Romênia, Espanha e Grécia. (Hubalek, 1999).

No verão de 1999, ocorreu uma alta mortalidade de corvos no bairro *Queens*, em Nova Iorque – Estados Unidos, onde posteriormente identificaram-se os primeiros casos de encefalite viral por VON em humanos, constituindo o primeiro surto do VON no hemisfério ocidental (Rappole, 2000; Petersen, 2001).

Este vírus demonstrou notável velocidade de disseminação, e em apenas dois anos após a sua detecção em Nova Iorque, foi capaz de se alastrar para o oeste dos Estados Unidos (CDC, 2002), sendo encontrado em mais da metade dos estados americanos em 2002, assim como, para o norte, no Canadá, e ao sul, nas Ilhas Cayman e região do Caribe. O ano de 2003 foi reconhecido como o de maior número de casos de meningoencefalite epidêmica por arbovírus no Hemisfério Ocidental e o de maior número de casos de meningoencefalite pelo vírus do Nilo Ocidental já reportado (CDC, 2003).

Existem algumas teorias que tentam explicar como teria ocorrido a disseminação quase global do VON, já que anteriormente estava aparentemente restrita às regiões da África, Ásia e Oriente Médio. Postula-se que aves migratórias provenientes da África teriam sido responsáveis pela introdução do vírus no sul da Europa. Outros acreditam que aves exóticas



importadas ou contrabandeadas poderiam estar envolvidas nos casos ocorridos na América do Norte. Outros ainda acham que um portador humano em período de viremia ou até mosquitos infectados transportados poderiam ter sido responsáveis pelo início da epidemia nos Estados Unidos (Solomon, 2003; Tyler, 2001). Independente da forma com que o vírus chegou ao continente ocidental, a proximidade genética entre as variantes israelense (IRS 98) e americana (NY 99) sugere que o vírus americano tenha origem no Oriente Médio (Petersen, 2001; Giladi M 2001).

#### **1.4. VON na América do Sul**

O primeiro relato de infecção por VON no continente sul-americano foi na Colômbia em 2005, onde 12 amostras de soro de cavalo foram reativas para o VON nas regiões de Córdoba e Sucre, sendo que nenhum destes cavalos havia sido vacinado contra VON ou viajado para fora daquela região (Mattar, 2005).

No ano seguinte foram relatados três casos de morte de cavalos no centro de treinamento do Jockey Clube em San Isidro, na Argentina, por infecção por VON, detectadas através de PCR em tempo real a partir de tecidos cerebrais (Morales, 2006).

Já em 2007, na Venezuela, de 791 amostras de sangue coletadas de cavalos, 141 reagiram para anticorpo anti-flavivírus e em 34 dessas amostras anticorpos anti-VON estavam presente. Além dos cavalos, foram reportadas 5 amostras soropositivas para o vírus em 3 espécies de aves (*T. leucomelas*, *C. flaveola* e *G. gallus*) residentes do país, indicando que o vírus poderia estar instalado na América do Sul (Lateef, 2007).

Recentemente a presença do VON foi observada em um grande número de aves em diferentes regiões da Argentina. No entanto, as aves que apresentaram anticorpos anti-VON em altos títulos eram espécies locais e não migratórias, o que reforça ainda mais a possibilidade de que o VON esteja instalado na América do Sul (Adrián Diaz, 2008).

Em 2011, as primeiras evidências sorológicas que o VON havia chegado ao Brasil foram reportadas (Pauvolid-Corrêa, 2011). O grupo estudou 168 amostras de soro de cavalo e 30 amostras de soro de jacaré da região do Pantanal, centro-oeste do Brasil. Estas amostras foram inicialmente testadas por blocking ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) específico para flavivírus, utilizando a técnica descrita por Blitvitch em 2003, a qual faz uso do anticorpo monoclonal 6b6c-1, e posteriormente as amostras soropositivas foram novamente testadas através do teste de redução específica em placa de anticorpos neutralizantes (PRNT – plaque-reduction neutralisation test) para o VON e para os flavivírus mais estreitamente relacionados ao VON que circulam no Brasil. Das 93 amostras soropositivas por ELISA (55,4%) de cavalos, 5 (3%) amostras foram positivas para VON, 9 (5,4%) foram positivas para o vírus da encefalite de St. Louis, 18 (10,7%) foram positivas o vírus Ilhéus e 3 (1,8%) amostras foram positivas para o vírus Cacipacore. Nenhuma das amostras de jacaré foi positiva utilizando o teste ELISA específico para flavivírus.

## 1.5. Ecologia

As aves são os hospedeiros e reservatórios naturais do VON, o qual pode infectar mais de 150 espécies de pássaros, especialmente corvos, pardais e melros. Além das aves, o VON já foi isolado a partir de mosquitos como: *Aedes*, *Culex*, *Anopheles*, *Minomya* e *Mansonia*, na África, Ásia e Estados Unidos (Ilkal, 1997; Burke, 2001). Quatorze espécies de *Culex*, especialmente o *Culex pipiens*, são as mais suscetíveis à infecção pelo vírus por terem o hábito de se alimentar de um amplo número de espécies de aves (Turell, 2000; Kulasekera, 2001; Jupp, 2001; CDC, 2003).

O homem, assim como cavalos, cães e outros animais domésticos são hospedeiros incidentais, que apresentam baixa viremia, não estando envolvidos com o ciclo do parasita no meio ambiente (Kramer, 2001; CDC, 2003; PAHO, 2002). A multiplicação do VON no ciclo pássaro-mosquito-pássaro se dá quando mosquitos adultos emergem no início da primavera e prolonga-se até o outono. Entre os humanos, o pico da doença ocorre no fim do verão e começo do outono. O fato de ter sido observado que 99% dos casos descritos em 2002 ocorreram entre 1º de julho e 31 de outubro (hemisfério Norte) levou à associação dos casos com o período em que os insetos fêmeas (vetores) estariam mais ativos.

Nos Estados Unidos, um eficiente sistema de investigação epidemiológica possibilitou o reconhecimento de que aves migratórias desenvolveram um papel fundamental na disseminação do VON a partir de Nova York (onde os primeiros casos de VON foram detectados) para o sul e oeste do país (Petersen, 2002). Nos estados do sul dos EUA, e talvez em outros países com condições

climáticas ideais do Hemisfério Sul, inclusive o Brasil, é possível que haja transmissão durante o ano todo (CDC, 2002; Nash, 2001).

De qualquer maneira, independentemente do exato mecanismo responsável pela epidemia atual do VON que acomete os dois hemisférios, hoje existem evidências significativas de quatro modos de transmissão do VON entre humanos: 1) transfusão de sangue; 2) transplante de órgãos; 3) transplacentária, e 4) aleitamento materno (Solomon, 2003; Brinton, 2002; Southam, 1954).

## **1.6. Introdução do VON na América Latina - Aves**

As aves migratórias desempenharam um papel fundamental na disseminação mundial do vírus, tanto no eixo norte-sul (desde a África do Sul até Rússia) quanto no eixo leste-oeste (desde Marrocos e Portugal, até Indonésia e Filipinas) (Rappole, 2000).

A América do Sul recebe anualmente centenas de espécies de aves migratórias provenientes do hemisfério norte-americano, principalmente das regiões Neárticas, áreas onde o vírus tem sido detectado recentemente (Sick, 1997; Pereira, 1997). Essas aves, quando migram para a América do Sul, provavelmente utilizam as rotas do leste americano, onde há regiões de baixa elevação, passando pelo Golfo do México, Ilhas das Antilhas, chegando à América do Sul pela costa da Venezuela e Colômbia. A partir deste ponto as aves podem utilizar quatro rotas distintas de migração para o sul: 1) Rota Cisandina; 2) Rota Brasil Central; 3) Rota do Rio Negro e Pantanal; 4) Rota Atlântica (Stotz, 1992). Como podemos observar na Figura 1 das quatro rotas

possíveis para a migração, três delas passam pela Amazônia, uma provável porta de entrada para o VON no Brasil.

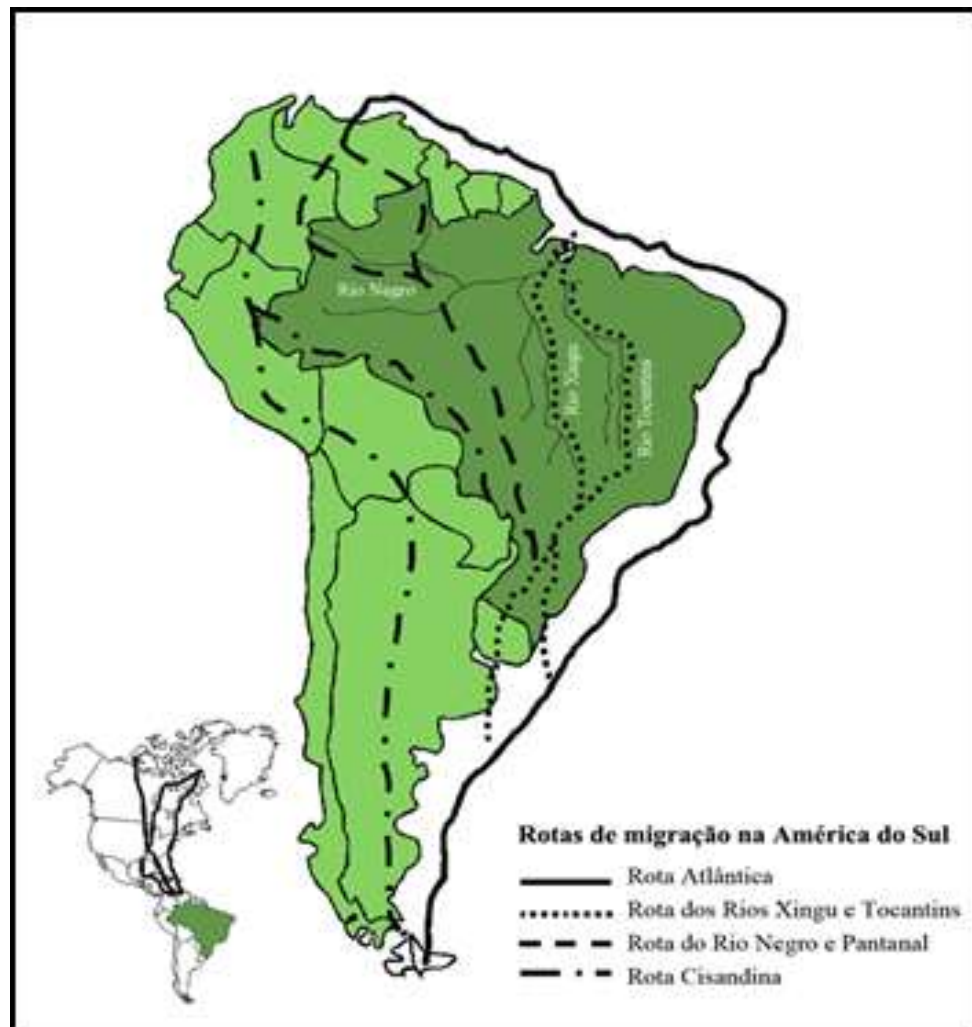


Figura 1 - Rotas de migração das aves na América do Sul (Luna, EJA 2003)

No Brasil, são conhecidas 97 espécies de aves provenientes do hemisfério norte e 73 espécies que realizam deslocamentos em direção ao norte da América do Sul. Sabe-se também, que 18 espécies de aves estão associadas aos deslocamentos verticais nos Andes e nas montanhas do sudeste brasileiro bem como aos movimentos motivados por florações, frutificações e fatores climáticos (Ferreira, 1994; Sick, 1997; Pereira, 1997).

Entre as diversas ordens de aves, seu comportamento migratório varia a ponto de influenciar a escolha das rotas. Aves da ordem passeriforme preferem deslocar-se por ambientes terrestres como matas, campos e o cerrado. Outras aves, englobadas pelo grupo dos não-passeriformes, apresentam hábitos aquáticos, daí seguirem rotas que sigam o mar ou grandes coleções de água. Note-se que os passeriformes, justamente por estarem associados a ambientes terrestres, aproximam-se mais das áreas urbanizadas, podendo ser responsáveis pela introdução do VON em cidades que passem durante sua migração.

## **1.7. Diagnóstico**

A infecção pelo VON é confirmada pela detecção de componentes virais proteicos, os antígenos e/ou anticorpos contra os mesmos, ou genômicos, ou ainda pela recuperação do mesmo através de crescimento em cultura de células de mamíferos ou mosquitos (Johnson, 2001).

O VON pode ser facilmente identificado em exames de amostras de tecido cerebral *postmortem* com o uso de técnicas de imuno-histoquímica.

O teste laboratorial comumente usado para o diagnóstico rápido de infecção pelo VON é a detecção de imunoglobulina M (IgM) e de IgG pelo método ELISA. Como esses testes não são totalmente específicos para VON, o diagnóstico depende do isolamento do vírus e da confirmação pelo teste de redução específica em placa de anticorpos neutralizantes, muito embora vários testes laboratoriais tenham sido desenvolvidos para um rápido diagnóstico (Code of Federal Regulations. FDA 2005; Lanciotti, 2000).

O teste ELISA para detecção de VON pode ser feito no soro ou LCR (líquido cefalorraquidiano, que é específico para infecção de SNC), sendo que 50% dos pacientes apresentam IgM positivo na admissão e 95% positivam até o 10º dia, aproximadamente. Estudos longitudinais de infecção pelo VON têm demonstrado que a IgM específica anti-VON pode persistir no soro por até 12 meses ou mais. Portanto, a presença de anticorpo IgM específico anti-VON em amostra de soro pode não ser necessariamente diagnóstico de infecção aguda pelo VON, exigindo-se cautela na interpretação do resultado de IgM positivo sem quadro clínico compatível (FDA, 2002; Bernard, 2002).

Testes sensíveis e rápidos para a detecção do VON utilizando a reação em cadeia de polimerase-transcriptase reversa (RT-PCR) e PCR em Tempo Real têm sido recentemente descritos, baseando-se em uma metodologia simplificada e permitindo a detecção de quantidades inferiores a 0,1 unidades formadoras de placa (PFU) (Gandelman-Marton, 2003; Marfin, 2001; Lanciotti, 2001; Brinton 2002). Utiliza-se também a técnica do TMA (transcription mediated amplification), como outra opção ao PCR, uma vez que apresenta resultados semelhantes quanto à sensibilidade.

O Termo “Janela imunológica” designa o intervalo entre a infecção pelo VON e a detecção de anticorpos anti-VON no sangue através de exames sorológicos (ELISA). Estes anticorpos são produzidos pelo sistema imune do organismo em resposta ao vírus, indicando nos exames a confirmação da infecção pelo vírus. Para o VON, o período da janela imunológica é normalmente de 3 a 14 dias (Stramer, 2005; Busch,2005), mas em alguns casos pode ser mais prolongado.

Se um teste de detecção por sorologia de VON é feito durante o período da janela imunológica, há grande possibilidade de um resultado falso-negativo, caso a pessoa esteja realmente infectada. Portanto, se o teste for feito neste período e o resultado for negativo, é necessário realizar um novo teste, dentro de 14 a 28 dias (Stramer, 2005). Neste período ocorrerá a soroconversão, que é o reconhecimento do VON pelo organismo e a produção de anticorpos para combater o vírus.

Uma maneira de diminuir os resultados falso-negativos é a utilização de outra metodologia de diagnóstico, o teste de ácido nucléico (NAT-nucleic acid test), que visa buscar na amostra o RNA viral e não a resposta do organismo a este agente. Esse teste foi introduzido em 1995 pela indústria do plasma com o objetivo de responder às rigorosas normas impostas pela União Europeia aos produtos derivados de plasma humano, também sendo adotado em bancos de sangue visando diminuir o risco de uma possível transmissão viral por transfusão, já que este teste permite detectar agentes virais como o HIV, o HCV e o HBV durante o período da “janela imunológica” nas infecções virais agudas que não foram detectadas pelos métodos convencionais de rastreio (Laperche,2008; Wendel, 2007).



## **1.8. Detecção em Doadores de Sangue e Órgãos**

### **Sólidos**

Devido às observações de que o VON pode causar viremia transitória após a infecção, e pelo grande número de portadores assintomáticos ou que apresentam quadro clínico leve, sugeriu-se que este vírus pudesse ser transmitido por transfusão de sangue e/ou hemocomponentes.

Em 2002, apenas três anos depois do seu aparecimento no hemisfério ocidental, o VON causou a maior epidemia de encefalite por arbovírus da história dos Estados Unidos. Investigações epidemiológicas feitas pelo grupo de Pearler nesse mesmo ano demonstraram que 23 pacientes, com infecção confirmada pelo VON, foram infectados através de bolsas sangue contaminadas (Biggerstaff, 2002; Campbell, 2002; Pealer, 2003). Modelos matemáticos sugeriram que centenas de pessoas foram infectadas por esta mesma via.

Em julho de 2003, pouco antes de uma nova onda de casos, a partir de colaboração entre hemocentros, fabricantes de kits de teste e agências governamentais, foi implantada uma metodologia para triagem através do teste de ácido nucléico, em mini pool de 6 ou 16 doações de sangue ou até mesmo individualmente (dependendo do fabricante do kit), com o objetivo de identificar as bolsas contaminadas.

Após a implementação da triagem para o VON nos hemocentros americanos, Busch reportou 183 casos (1 para 3703) de doações virêmicas no período de primeiro de julho a 31 de outubro através do teste NAT - minipool. Outros 30 adicionais também foram identificados através do teste NAT-

individual. De todas as doações virêmicas, 5% foram identificadas apenas com o NAT – individual (sendo que essas amostras eram negativas para IgM), 29% foram identificadas apenas por NAT individual após a soroconversão, e 66% foram detectadas através do teste em minipool.

Susan Stramer, utilizando amostras de doações de sangue da Cruz Vermelha Americana, identificou 586 amostras positivas para o VON durante os anos de 2002 a 2004. Em 2002, a prevalência desse agente viral em doações foi de 1 para 1057 doações provindas de seis áreas de alta incidência do VON. Em 2003, a primeira amostra positiva coletada foi no mês de junho em Los Angeles, a partir de um doador que tinha voltado de viagem do Colorado, e a última bolsa de sangue positiva coletada foi em primeiro de dezembro na Geórgia. Naquele ano foram identificadas 436 doações positivas para VON das 2.935.249 coletadas (prevalência: 1 para 6732 doações). Das 436 bolsas de sangue positivas, 328 foram coletadas a partir de doadores do Kansas e Nebraska, cuja prevalência da região foi estimada em 1 para 147 doações. Já em 2004, a primeira doação positiva foi coletada no mês de junho em Phoenix, Arizona e a última no mês de outubro em Los Angeles. Neste ano foram identificadas 104 bolsas de sangue positivas para o VON, de um total de 2.386.630 doações (prevalência de 1 para 22.948). Cinquenta e quatro (52%) das 104 doações positivas para esse agente etiológico foram coletadas a partir de doadores de quatro Estados ao Sul da Califórnia, concedendo a essa região uma prevalência de 1 em 1566 doações (Stramer 2005). Podemos observar na Figura 2 a sazonalidade da epidemia nos EUA, ficando claro que é uma doença que ocorre preferencialmente no verão americano, já que os maiores números de casos se concentram nos meses de junho a setembro.

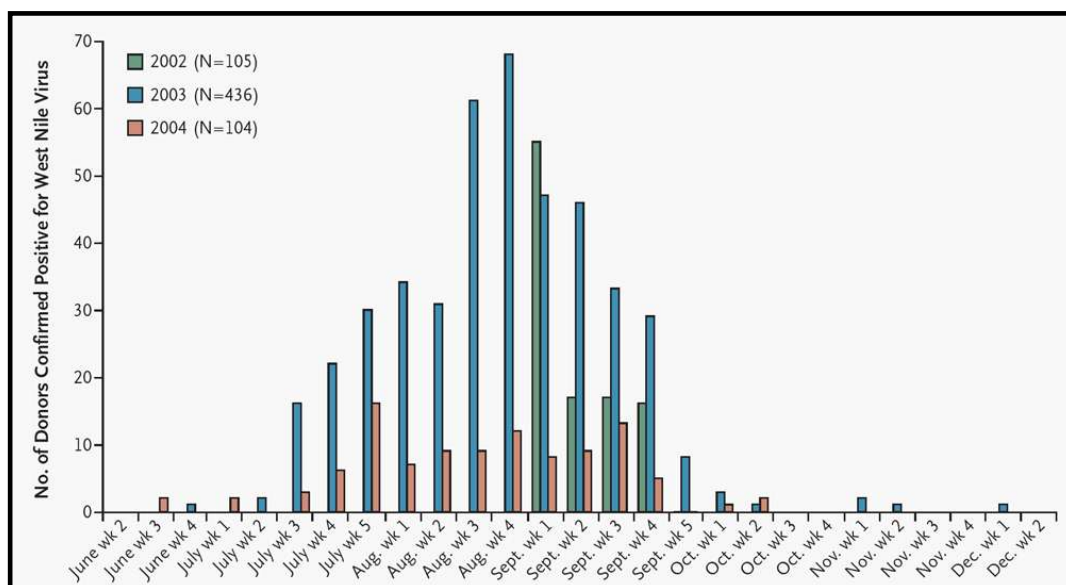


Figura 2 - Número de doadores de sangue americanos que foram confirmados sendo positivos para o RNA do VON em 2002, 2003, e 2004, de acordo com a semana de coleta (Susan L. Stramer 2005).

Mesmo após a implementação deste teste, foram identificados mais sete casos de transmissão transfusional a partir de bolsas de sangue falso negativas para o teste NAT em *mini-pool*. Esse fato pode ser decorrente da baixa viremia que o vírus pode atingir no plasma, inferior ao limite de detecção dos métodos empregados.

## 1.9. Transmissão por Transplante de Órgãos

Além da transmissão transfusional, um caso de transmissão do VON através de transplante de órgãos foi descrito, no qual o doador foi infectado um dia antes da doação dos órgãos por uma bolsa de sangue contaminada (Iwamoto, 2003), todos os pacientes que receberam os órgãos adoeceram. Posteriormente, o VON foi confirmado em outros três de quatro pacientes de órgãos transplantados de um doador comum infectado. Dois receptores desenvolveram doença neuroinvasiva, um teve infecção de VON assintomática e um quarto recipiente não foi aparentemente infectado (Petersen, 2002). Em

ambos os casos os órgãos transplantados foram fígado, rim e pulmão e há evidências que o VON permaneça alojado nos mesmos, mesmo depois do clareamento viral (Southam, 1954).

Outro fato interessante é que estes vírus podem aderir-se às células vermelhas do sangue e a proporção de vírus aderente pode ser maior que a circulante no plasma, além de manterem a capacidade de infectar novas células, como foi demonstrado em células Vero em cultura (Rios, 2007).

### **1.10. Sazonalidade**

A incidência de doenças relacionadas ao VON é sazonal em zonas temperadas na América do Norte, Europa e Mediterrâneo, com o pico da atividade ocorrendo nos meses de verão e início do outono, quando ocorre a propagação dos vetores. Quando esse vírus atinge regiões equatoriais, ele perde a característica sazonal e pode ser encontrado durante o ano todo, porque o clima favorece a manutenção tanto dos vetores (mosquitos), quanto dos hospedeiros amplificadores (pássaros) (Stramer, 2005; Hayes, 2005).

Na época de ocorrência da doença, os testes realizados nos bancos de sangue, podem ser através da investigação individual ou em grupo (mini-pool) contendo 6 ou 16 amostras de doações já falou a mesmíssima coisa acima, ou lá ou cá. Há estudos demonstrando um pequeno número de casos de transmissão transfusional, todas decorrentes de bolsas falso negativas no teste NAT - mini-pool devido à baixa viremia dos doadores (CDC, 2004), as quais, teriam sido detectadas como positivas se fossem testadas em metodologia individual. O teste NAT-mini-pool falha em detectar 23% dos doadores

infectados em comparação com o NAT - individual (CDC, 2004). Porém a implementação do teste NAT – individual em todos os bancos de sangue como único teste para VON é logisticamente e financeiramente inviável. Por causa disso, o teste NAT – individual é utilizado em apenas algumas áreas epidêmicas. Para que ocorra a mudança do teste NAT – minipool, para o individual, é necessário que haja 2 casos de teste em minipool repetidamente positivos juntamente com uma taxa semanal de 1 para 1000 doações positivas, algoritmo denominado “gatilho” (Custer, 2004).

### **1.11. *Flavivirus* em doadores de sangue**

Além do VON, pacientes que necessitam de transfusão sanguínea podem estar sujeitos a outras infecções causadas por outras espécies de *flavivirus* transmissíveis através do sangue, como é o caso do vírus da Dengue, Febre Amarela, Hepatite C e G, vírus da encefalite de St. Louis e vírus da encefalite japonesa. Entre estes, destaca-se o vírus da Hepatite C que tem sua transmissão transfusional comprovada e para o qual a triagem sorológica e molecular é realizada em dezenas de países. Já a transmissão transfusional do vírus da Dengue foi descrita em um número muito pequeno de casos, em contraste com os milhões de casos observados anualmente. A presença do vírus em doadores de sangue já foi verificada, e uma vez que não se faz qualquer teste de rastreio para este agente, maiores investigações são necessárias para entender a baixa eficácia de sua transmissão transfusional, ou ainda, a razão de não provocar os sintomas usuais quando transmitida por esta via (Wendel S 2008).

## 2. Justificativa

Conforme exposto, há uma grande probabilidade do VON já ter sido introduzido em nosso país. No início do projeto não havia na literatura nenhum estudo experimental publicado com quaisquer tipos de amostras, demonstrando ou descartando a existência do VON no Brasil.

A população de doadores de sangue representa um universo amostral interessante por representar a população em geral, e por permitir a obtenção de um grande número de amostras simultaneamente. A localização do HEMOAM (Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas) em Manaus, recebendo amostras de toda população do estado do Amazonas e o HEMOSUL (Hemocentro de Mato Grosso do Sul), próximo da área onde foram identificados os soros de equinos positivos para o VON, são estratégicos para esta vigilância. A região do HEMOAM é fronteira à Venezuela e a Colômbia, onde o vírus já foi identificado, e com intenso fluxo de pessoas entre as regiões. Além dos fatores geográficos e faunísticos do estado do Amazonas, o HEMOAM é uma instituição de excelência no Estado, com um parque tecnológico instalado e contando com recursos humanos qualificados, permitindo a continuidade deste projeto de forma sistemática na região, permitindo inclusive a extensão para outros alvos como aves, mosquitos e pacientes com encefalite a esclarecer.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Desenho do Estudo**

Foi realizado um estudo prospectivo, observacional.

#### **3.2. Amostras Humanas**

##### **3.2.1. Doadores de Sangue**

Foram coletadas no total 5346 amostras de doadores de sangue, 2202 provenientes do Hemocentro do Amazonas (HEMOAM, Manaus) e 3144 provenientes do Centro de Hemoterapia e Hematologia de Mato Grosso do Sul (HEMOSUL, Campo Grande). As amostras do HEMOAM foram coletadas em tubos tipo K<sub>2</sub>EDTA com gel separador (Greiner Bio-One), centrifugadas a 1.600 x g durante 20 minutos e congelados a -20°C. As amostras do Hemosul foram coletadas em tubos Gel BD SST® II Advance (BD Diagnostics), centrifugadas a 1.600 x g durante 20 minutos e congelados a -20°C. Estes tubos então foram enviados em recipientes térmicos contendo gelo seco através de uma transportadora ao laboratório onde foram processadas. Após o processamento das amostras do HEMOAM, o restante do plasma foi aliquoteado em microtubos de 2 mL e armazenados a -70°C no laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo. As amostras de Mato Grosso do Sul foram descartadas após o processamento.

Nenhuma das amostras de doadores humanos foi congelada e descongelada mais de três vezes.

### **3.2.2. Líquido Cefalorraquidiano**

O professor Hélio Gomes, Departamento de Neurologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, Brasil gentilmente cedeu 51 amostras de líquido de pacientes com meningoencefalites de etiologia desconhecida para serem testadas para o VON. Estas amostras foram coletadas através de punção lombar por um profissional médico.

### **3.2.3. Soros de Febre de origem indeterminada**

A pesquisadora Katia Torres, disponibilizou 198 amostras de soro de pacientes com febre de origem indeterminada da fundação de Medicina Tropical de Manaus.

### **3.2.4. Amostras de Equinos**

A pesquisadora Tatiana Ometto, do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, Brasil, concedeu 293 amostras de soro de equinos da região do Mato Grosso e 63 biópsias cerebrais também de equinos que foram a óbito por meningoencefalites de etiologia desconhecida da região do Pantanal, centro-oeste do Brasil. O diagnóstico de raiva foi



descartado nestas amostras. Estas amostras de biópsias foram extraídas por meio da utilização do kit Qiagen Tissue (Qiagen).

### **3.3. Critérios de Inclusão**

#### **3.3.1. Doadores de sangue**

Para este estudo foram selecionados doadores de sangue do sexo feminino ou masculino (obrigatoriamente acima de 18 anos, pois é um critério para a doação de sangue), da capital ou interior dos Estados participante do estudo, cadastrados em uma das unidades de coleta e transfusão de sangue vinculadas ao HEMOAM, ao HEMOSUL, considerados aptos para a doação e que tenham lido e assinado o TCLE.

#### **3.3.2. Para amostras de líquido**

Foram incluídos neste projeto amostras de líquido de pacientes com meningoencefalites de etiologia desconhecidas

### **3.4. Critérios de Exclusão**

Para as amostras de doadores de sangue o critério de exclusão foi o candidato ser considerado inapto para a doação após a triagem clínica. Não houve critérios de exclusão para amostras de líquido e equinos.

### **3.5. Coleta da Amostra de Doadores de Sangue**

Nos estados onde ocorreram às coletas de amostras de doadores de sangue para este projeto, um profissional de saúde (que foi previamente orientado através de instruções e procedimentos operacionais padrão, voltados para estas atividades), realizou o procedimento de rotina para doadores de sangue e abordou o doador sobre o projeto convidando-o a participar voluntariamente do estudo após a apresentação dos objetivos e métodos desse, para isto, foi feito registro através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 1) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOAM e pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo – USP (CAPPesq).

### **3.6. Sistema automatizado cobas TaqScreen West Nile**

#### **Virus Test**

As amostras foram processadas na plataforma automatizada cobas s 201, da empresa Roche utilizando o equipamento cobas s201® e o TaqScreen West Nile Virus Test. Este é um teste qualitativo in vitro para a detecção direta do RNA do VON, podendo ser utilizado para rastreio de amostras individuais ou em pool constituídos de até 6 amostras.

Este teste utiliza uma técnica genérica de extração dos ácidos nucleicos no equipamento COBAS® AmpliPrep. O RNA viral é então detectado através de amplificação automática por PCR em tempo real no analisador COBAS® Taqman. O teste incorpora uma controle interno para a monitoração do desempenho do teste em cada teste individual, assim como a enzima AmpErase para reduzir a chance de contaminação por material previamente amplificado.

### **3.7. Princípios do Procedimento**

Este teste baseia-se em 4 processos principais:

- a) Pooling das amostras e pipetagem dos controles automático utilizando o pipetador Hamilton MICROLAB® STAR.
- b) Extração automática das amostras utilizando o equipamento COBAS® AmpliPrep.

c) Amplificação e detecção em tempo real dos produtos da PCR utilizando o analisador COBAS® TaqMan®.

d) Gestão automática dos dados utilizando o software de Pooling e Gestão de Dados (PDM).

**a) Pooling das amostras e pipetagem dos controles automático utilizando o pipetador Halmilton MICROLAB® STAR**

Nesta etapa ocorre a transferência das amostras a partir dos tubos primários das amostras para os tubos de reação necessários para o equipamento cobas s 201. Nesta etapa ocorre a formação dos pools de 6 amostras.

**b) Extração automática das amostras utilizando o equipamento COBAS® AmpliPrep.**

A extração das moléculas de RNA do VON e do RNA envelopado (controle interno) são processadas simultaneamente, seguindo 5 sequencias dentro do equipamento COBAS® Ampliprep:

- 1- Lise das partículas virais e inativação das nucleases a partir da inserção de uma solução de protease.
- 2- Ligação dos ácidos nucleicos na superfície das partículas de magnéticas de vidro.
- 3- Lavagem de substâncias não ligadas às partículas magnéticas e impurezas.

- 4- Redução da concentração salina.
- 5- Liberação das moléculas de RNA das partículas magnéticas de vidro a uma temperatura elevada com tampão de eluição.

**c) Amplificação e detecção em tempo real dos produtos da PCR utilizando o analisador COBAS® TaqMan®.**

**a. Amplificação**

Após o isolamento do ácido nucleico, o extraído é preparado para a PCR em tempo real. Nesta etapa é utilizado a mistura principal cobas TaqScreen WNV (WNV MMX), para a amplificação e detecção do RNA viral e do RNA do controle interno. Uma vez que é adicionado acetato de manganês na mistura principal WNV MMX, esta se torna ativada e permite que ocorra a transcrição reversa, seguida da amplificação por PCR de uma região altamente conservada do RNA do VON e do RNA do controle interno, utilizando iniciadores específicos. A detecção em tempo real do DNA amplificado é conseguida através da emissão crescente de sinais fluorescentes decorrentes da degradação nucleolítica-5' das sondas específicas para o VON e para o controle interno. São utilizados 2 corantes fluorescentes: sendo uma para marcar a sonda do controle interno e o outro para marcar a sonda do VON, permitindo assim a identificação simultânea do VON e do controle interno.

**b. Transcrição reversa e Amplificação por PCR**

As reações de transcrição reversa e de amplificação são realizadas com a enzima recombinante termoestável, a DNA polimerase Z05. Na presença de manganês, esta enzima apresenta atividades de transcrição reversa e de DNA polimerase, permitindo assim, que tanto a transcrição reversa como a amplificação por PCR ocorram na mesma mistura.

### **c. Amplificação Seletiva**

A amplificação seletiva do ácido nucleico alvo é conseguida com a utilização de iniciadores oligonucleotídicos específicos e a utilização da enzima AmpErase (uracil-N-glicosilase) e de trifosfato de deoxiuridina (dUTP). Esta enzima reconhece e catalisa a destruição de cadeias de DNA que contenham dUTP's, mas não de DNA contendo deoxitimidina ou RNA contendo ribouridina. A dUTP não se encontra no DNA natural, mas está sempre presente no produto da PCR, devido ao uso substitutivo de trifosfato de timidina pelo dUTP no reagente da WNV MMX. Isso faz com que os produtos da PCR anteriores se tornem suscetíveis à degradação pela ação da enzima, evitando assim uma possível contaminação. Esta enzima será inativada quando exposta a temperaturas acima dos 55°C, não destruindo os novos produtos da PCR.

### **d. Detecção**

Durante a amplificação por PCR, a elevada temperatura intermitente produzida durante os ciclos térmicos desnatura o produto da PCR alvo e do controle interno para formar uma cadeia simples de DNA. As sondas e os iniciadores oligonucleotídicos se hibridizam novamente com este DNA de cadeia simples, onde ocorre posteriormente a amplificação. A amplificação pela polimerase, hibridização e detecção da fluorescência das sondas do VON e controle interno ocorrem simultaneamente.

O cobas TaqScreen WNV MMX contém sondas de detecção que são específicas para o ácido nucleico do VON e do controle interno. Cada sonda está marcada com dois corantes fluorescentes, sendo que um atua como corante sinalizador e o outro como corante supressor. Um corante específico está associado com a sonda específica para o alvo do VON e é medido em um

comprimento de onda específico. Um segundo corante sinalizador está associado à sonda do controle interno e é medido em outro comprimento de onda. Este sistema permite a detecção do alvo amplificado do VON e do controle interno simultaneamente.

Antes de iniciar a amplificação por PCR, as sondas estão intactas e a fluorescência do corante sinalizador é suprimida pelo corante supressor devido à transferência de energia de tipo Förster. Durante a amplificação, as sondas hibridizam-se as sequências de DNA de cadeia simples específicas e são clivadas pela atividade da nucleasse 5' a 3' da DNA polimerase Z05. Uma vez que os corantes de sinalização e supressão estejam separados, a atividade fluorescente do corante sinalizador é captada pelo equipamento. Como a cada ciclo da PCR são geradas quantidades crescentes de sondas clivadas, ocorre o aumento concomitante do sinal de fluorescência do corante sinalizador.

A detecção em tempo real dos produtos da PCR é conseguida através da medição da fluorescência dos corantes sinalizadores liberados, representando o alvo de VON e controle interno.

#### **d) Gestão automática dos dados utilizando o software de Pooling e Gestão de Dados (PDM).**

O software ROCHE PDM Data Manager permite examinar os resultados. Este software atribui automaticamente a todos os testes resultados como não reativos, reativos ou inválidos, permitindo ao usuário aceitar ou não o resultado atribuído.

### **3.8. Reagentes**

Para o processamento total das amostras foram utilizados os seguintes reagentes, todos incluídos no Kit Cobas TaqScreen West Nile Virus Test.

#### **Cobas TaqScreen West Nile Virus Test**

##### **WNV CS1 - MGP – partículas Magnéticas de Vidro**

93% de isopropanol

##### **WNV CS2 - Lys – Reagente de Lise**

Citrato de sódio dihidratado

42,5% de tiocianato de guanidina

<14% de polidocanol

0,9% de Ditiotreitól

##### **WNV CS3 - Pase – solução de proteinase**

Tampão TRIS

<0,05% de EDTA

Cloreto de cálcio

Acetato de cálcio

≤7,8%de proteinase

##### **WNV EB – Tampão de eluição**

Tampão TRIS



≤0,002 de RNA de Poli rA (sintético)

EDTA

0,09% de Azida Sódica

#### **WNV CS4 - WNV MMX – Mistura principal do WNV**

Tampão Tricina

Acetato de potássio

Glicerol

<18% Dimetilsulfóxido

<0,07% de dATP, dCTP, dGTP, dUTP

<0,002 de iniciadores de VON a jusante e a montante

<0,002 de sonda de VON com marcação fluorescente

<0,002 de sonda para o controle interno com marcação fluorescente

<0,002 de aptâmero oligonucleotídico

<0,05% de DNA Polimerase Z05 (de origem microbiana)

<0,1% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilase)

0,08% de Azida Sódica

#### **WNV Mn<sup>2+</sup> - solução de Manganês WNV**

<0,6% de Acetato de manganês

Acido acético glacial

0,09% de Azida Sódica

**WNV IC – controle interno do VON**

Tampão Tris

≤0,002 de RNA de Poli rA (sintético)

EDTA

<0,001% de RNA do controle interno, não infeccioso encapsulado em proteína de cobertura do bacteriófago MS2

0,05% de Azida Sódica

**Cobas TaqScreen West Nile Virus control Kit**

**WNV (+) C – controle positive para o VON**

Tampão Tris

≤0,002 de RNA de Poli rA (sintético)

EDTA

<0,001% de RNA sintético de VON não infeccioso encapsulado em proteína de cobertura do bacteriófago MS2

0,05% de Azida Sódica

**WNV (-) C – controle negativo do VON (plasma humano)**

Plasma Humano Negativo, não reativo em testes aprovados para anticorpo contra HCV, anticorpo contra HIV1/2 e HBsAg; RNA do Von não detectável por métodos de PCR.

0,1% de conservante ProClin® 300

**Cobas TaqScreen West Nile Wash Reagent**  
**TS WR – reagente de lavagem cobas TaqScreen**

Citrato de sódio dihidratado

0,1% de conservante Metilparabeno

### **3.9. Rotina**

As amostras são processadas em lotes e cada lote é composto por 24 reações, podendo ser até 22 amostras em pools mais uma reação referente ao controle positivo e outra ao controle negativo ou ainda 22 reações de amostras individuais mais uma reação de controle negativo e outra de controle positivo. Cada pool é idealmente composto por 6 amostras individuais, sendo assim cada lote pode ser composto por 22 reações com 22 amostras individuais ou 22 reações em pools de 6 totalizando 132 amostras. A pipetagem dos tubos primários para os tubos de reação dos lotes são efetuadas pelo pipetador Hamilton MICROLAB® STAR. Este processo pode durar cerca de 20 minutos a 1 hora dependendo de como os lotes são arranjados.

Após a pipetagem nos tubos de reação do lote, estes são transferido para o equipamento COBAS® AmpliPrep, onde sofrerão extração dos ácidos nucleicos. Este equipamento pode ser abastecido com até 3 lotes por vez e após o primeiro lote ter sido totalmente processado, pode-se colocar novo lote ainda com o equipamento em funcionamento. Isto pode ser feito a cada momento em que um lote é totalmente processado. O processo de extração do

primeiro lote do dia leva cerca de 2 horas, sendo que os lotes subsequentes ao primeiro são concluídos cerca de 30 minutos após.

Quando todas as amostras e os controles de um lote foram totalmente extraídos, eles são transferido automaticamente para o analisador COBAS® TaqMan®, onde as amostras serão amplificadas e detectadas por fluorescência. Este processo leva cerca de 1 hora e 30 minutos.

### **3.10. Controle positivo para verificação do Kit**

Amostras confirmadamente positivas para o RNA do VON provindas de doadores de sangue da Cruz Vermelha Americana, gentilmente cedidas pela Dra. Susan Stramer, foram utilizadas como controle positivo para a padronização da reação no equipamento s 201 da Roche.

### **3.11. Controles do Kit**

#### **Controle positivo**

Para cada lote de reação o Kit cobas® TaqScreen West Nile Virus Test utiliza um controle positivo que é composto por RNA sintético de VON não infeccioso encapsulado em proteína de envelope do bacteriófago MS2.

#### **Controle interno positivo**

O Kit cobas® TaqScreen West Nile Virus Test possui um controle interno positivo de *armored* RNA, que é utilizado em todas as amostras, servindo de controle para a preparação, extração, amplificação e detecção do processo de

cada amostra. Este controle interno é processado simultaneamente com as amostras.

### **3.12. Controle Negativo**

Para cada lote de reação o Kit cobas® TaqScreen West Nile Virus Test utiliza um controle negativo que é composto por plasma humano negativo. Este plasma é não detectável para o RNA do VON em metodologia de PCR além de ser não reativo em testes aprovados para anticorpo contra HCV, anticorpo contra HIV-1/2 e HBsAg.

### **3.13. Características de desempenho**

#### **3.13.1. Reprodutibilidade**

A reprodutibilidade do cobas TaqScreen West Nile Virus Test utilizando o equipamento cobas s 201 foi avaliada testando um painel aleatório, cego de 21 membros, composto por seis amostras de plasma negativo, seis amostra de plasma positivo a uma concentração de 0,49x o limite de detecção (LD) do teste, e três amostra de plasma positivo, cada uma a concentração de 2,5x, 5,0x e 10x o LD. Estes testes foram efetuados em três locais diferentes com um operador em cada local, utilizando 3 lotes do kit e 1 sistema cobas s 201. Em cada local, foram testados 4 painéis com os controles positivos e negativos associados, todos os dias durante 5 dias, somando um total de 180 testes de cada membro do painel. Foram avaliados todos os dados de reprodutibilidade

válidos, calculando a percentagem de resultados de teste reativos para cada nível do painel. Os dados foram analisados por lote de kit, local/operador, dia/execução e geral. O estudo demonstrou um desempenho consistente do cobas TaqScreen West Nile Virus entre lotes, locais/operadores do teste e dias/execução (dados não mostrados).

### **3.13.2. Sensibilidade Analítica**

#### **Linhagem 1**

O LD do cobas TaqScreen West Nile Vius Test para a linhagem 1 foi avaliada utilizando o Health Canada West Nile Virus Reference Standard (Saldanha, J et al, 2005). O LD foi determinado com base na taxa de positividade com limites inferiores de confiança de 95% (unilateral), assim como calculado por análise de PROBIT para estimar o LD de 95% e os intervalos de confiança bilaterais de referência de 95% para o painel (dados não mostrados). O LD de 95% utilizando este painel para a linhagem 1 foi de 40,3 cópias/mL.

#### **Linhagem 2**

O LD do cobas TaqScreen West Nile Vius Test para a linhagem 2 foi avaliado utilizando o Painel de Qualificação do RNA do VON QWN701 (Briese, T et al 2002; Hayes et al 1999). O LD foi determinado com base na taxa de positividade com limites inferiores de confiança de 95% (unilateral), assim como calculado por análise de PROBIT para estimar o LD de 95% e os intervalos de confiança bilaterais de referência de 95% para o painel (dados não mostrados). O LD de 95% utilizando este painel para a linhagem 2 foi de 3,8 cópias/mL.

### **3.13.3. Especificidade Analítica**

A especificidade analítica do cobas TaqScreen West Nile Virus Test foi avaliada utilizando um painel de 52 microrganismos, incluindo 47 isolados virais, 4 estirpes bacterianas e 1 isolado de levedura. Os microrganismos foram adicionados a plasma humano normal, negativo para o vírus, e testado com e sem o VON adicionado a uma concentração de 3 x o LD. Com exceção de 4 isolados da família do Vírus da encefalite Japonesa, (vírus da encefalite Japonesa, vírus da encefalite de Murray Valley, vírus da encefalite de Saint Louis e vírus Kunjin), para todos os outros foram obtidos resultados não reativos para todas as amostras sem a adição do VON, e foram obtidos resultados reativos para todas as amostras nas quais foram adicionado o VON. Isto ocorre porque estes vírus compartilham homologia na sequência de nucleotídeos com o VON, e conseqüentemente com os iniciadores e sondas.

## 4. Resultados

A validação da corrida é feita pelo próprio software do cobas s 201. Para tanto, ele leva em consideração os resultados dos controles positivos e negativos sendo que os resultados das amostras são válidos apenas quando o lote a qual pertencerem for válido. O lote é formado pelas amostras e/ou pools de amostras mais uma réplica do controle positivo e uma réplica do controle negativo. A todo lote processado é atribuído um estado: válido ou inválido. Quando os controles do lote foram válidos, o lote foi considerado válido. Porém, caso os controles falhem todo o lote é considerado inválido. Esta invalidação de resultados com base em falhas de controles de reação é efetuada automaticamente pelo software do equipamento.

Para que o controle negativo seja válido, o resultado interpretado deve ser não reativo para o VON e o controle interno deve ser considerado reativo. Se o controle interno obtiver resultado não reativo, o resultado emitido será inválido.

Para que o controle positivo seja válido, o resultado interpretado de ser reativo para o VON e o controle interno deve ser considerado reativo também. Se o controle interno for considerado não reativo, o resultado interpretado será inválido.

Como há a adição de um controle interno para cada amostra ou pool este resultado também é considerado na validação dos mesmos. Para que a amostra ou o pool de amostras sejam considerados não reativo e válido, o controle interno associado deve ser válido e a amostra não deverá apresentar amplificação para o VON, caso contrário, o resultado deve ser considerado



inválido, devendo ser novamente processada. Já para que uma amostra ou o pool de amostras sejam consideradas reativas válidas, aquela amostra ou pool deverá ser reativa para VON, não importando o resultado do controle interno, o qual poderá ser reativo ou não-reativo.

Caso um pool de amostras seja um reativo válido, este pool será desmembrado e testado individualmente.

As 2202 amostras de doadores de sangue coletadas no Estado do Amazonas pelo HEMOAM foram processadas em 26 lotes, com pools de 6 amostras, todos com controle positivo, negativo e controle internos válidos.

(Tabela 2)

**Tabela 2 - Resultado das amostras de doadores de sangue do Estado do Amazonas, provenientes do HEMOAM.**

<b>Nº do Lote</b>	<b>Nº de pools / lote</b>	<b>C+</b>	<b>C-</b>	<b>CI dos pools</b>	<b>VON</b>
Lote 1	19	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 2	20	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 3	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 4	5	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 5	19	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 6	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 7	3	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 8	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 9	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 10	21	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 11	1	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 12	20	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 13	2	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 14	19	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 15	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 16	21	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 17	2	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 18	2	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 19	19	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 20	1	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 21	21	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 22	20	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 23	20	Válido	Válido	Válido	Negativo

Lote 24	17	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 25	4	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 26	1	Válido	Válido	Válido	Negativo

As 3144 amostras de doadores de sangue coletadas no Estado do Mato Grosso do Sul pelo HEMOSUL foram processadas em 26 lotes, com pools de 6 amostras, todos com controle positivo, negativo e controle interno válidos. (Tabela 3)

**Tabela 3 - Resultado das amostras de doadores de sangue do Estado do Mato Grosso do Sul, provenientes do HEMOSUL.**

<b>Nº do Lote</b>	<b>Nº de pools / lote</b>	<b>C+</b>	<b>C-</b>	<b>CI dos pools</b>	<b>VON</b>
Lote 27	21	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 28	21	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 29	20	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 30	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 31	20	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 32	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 33	19	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 34	19	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 35	16	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 36	21	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 37	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 38	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 39	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 40	17	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 41	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 42	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 43	20	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 44	17	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 45	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 46	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 47	14	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 48	20	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 49	21	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 50	19	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 51	20	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 52	21	Válido	Válido	Válido	Negativo

Os 293 soros de equinos provenientes do Mato Grosso foram testados individualmente. Todas as amostras foram negativas para o VON (Tabela 4).

**Tabela 4 - Resultado das amostras de soros de equinos do Estado do Mato Grosso, Brasil.**

<b>Nº do Lote</b>	<b>Nº de amostras / lote</b>	<b>C+</b>	<b>C-</b>	<b>CI dos pools</b>	<b>VON</b>
Lote 53	10	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 54	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 55	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 56	20	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 57	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 58	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 59	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 60	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 61	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 62	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 63	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 64	21	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 65	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 66	22	Válido	Válido	Válido	Negativo

Além dos soros dos equinos, as biópsias cerebrais de equinos que foram a óbito por meningoencefalites de etiologia desconhecida da região do Pantanal também foram testadas individualmente. Todas as 63 amostras foram negativas para o VON (Tabela 5)

**Tabela 5 - Resultado das amostras de biópsia cerebrais de equinos.**

<b>Nº do Lote</b>	<b>Nº de amostras / lote</b>	<b>C+</b>	<b>C-</b>	<b>CI dos pools</b>	<b>VON</b>
Lote 67	19	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 68	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 69	22	Válido	Válido	Válido	Negativo

As 51 amostras cedidas pelo professor Hélio Gomes, de líquor de pacientes com meningoencefalites de etiologia desconhecida foram testadas

individualmente para o VON. Todas obtiveram resultados negativos para o vírus (Tabela 6).

**Tabela 6 - Resultado das amostras de líquido de pacientes com meningoencefalite de etiologia desconhecida.**

<b>Nº do Lote</b>	<b>Nº de amostras / lote</b>	<b>C+</b>	<b>C-</b>	<b>CI dos pools</b>	<b>VON</b>
Lote 70	13	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 71	13	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 72	25	Válido	Válido	Válido	Negativo

Também foram testados individualmente 198 soros de pacientes que apresentaram febre e sintomas de meningoencefalite de etiologia desconhecida, providas do Instituto de Medicina Tropical de Manaus. (Tabela 2 - Resultado das amostras de doadores de sangue do Estado do Amazonas, provenientes do HEMOAM. Tabela 7)

**Tabela 7 - Resultado dos soros de pacientes com meningoencefalite de etiologia desconhecida de Manaus**

<b>Nº do Lote</b>	<b>Nº de amostras / lote</b>	<b>C+</b>	<b>C-</b>	<b>CI dos pools</b>	<b>VON</b>
Lote 73	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 74	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 75	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 66	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 77	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 78	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 79	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 80	22	Válido	Válido	Válido	Negativo
Lote 81	22	Válido	Válido	Válido	Negativo

## 5. Discussão

Assim como a epidemia de HIV, a introdução do vírus do Oeste do Nilo nos Estados Unidos expôs novamente a fragilidade do estoque sanguíneo aos agentes emergentes. Os atuais métodos moleculares permitiram uma solução rápida e eficaz, servindo como um alerta para outros países, pois a disseminação do VON pode ocorrer e está ocorrendo, conforme discutido anteriormente.

Levando em consideração que a maioria dos casos de infecção por VON é assintomático, podendo chegar até 70% dos casos, ou produz sintomas não proibitivos para a doação (Custer B, 2009), tentamos avaliar a hipótese de possível introdução do VON no Brasil. Munidos de uma amostragem de doadores de sangue aptos para doação das regiões Norte (provenientes do HEMOAM) e Centro-Oeste (provenientes do HEMOSUL), chegamos a um resultado a princípio satisfatório para o país, já que não foi evidenciado o RNA viral em nenhuma das amostras. Este resultado, embora tranquilizante, deve ser avaliado sob duas óticas; primeiramente, a da insuficiência técnica e amostral de nosso estudo ou secundariamente devido aos fatores biológicos que explicariam a resistência dos ecossistemas brasileiros à entrada do VON.

Dentre a primeira ótica, um fator que poderíamos destacar seria que no primeiro dia de incubação e após o nono dia, este vírus torna-se indetectável para metodologias NAT no formato de *minipool*, pois a carga viral fica abaixo do limite de detecção. Isso se deve à própria cinética do vírus que alcança a sua carga viral máxima por volta do quinto dia após a infecção (Petersen, 2010). Assim sendo, como todas as amostras de doadores de sangue foram testadas

em *minipool*, pode ser que alguma possível amostra positiva não tenha sido detectada, afinal, a janela de tempo fica reduzida a apenas oito dias. (Petersen LR, 2010). Para reduzir este tipo de efeito, os Estados Unidos, onde a epidemia por este vírus é significativa e um problema de saúde pública, possuem um sistema de gatilho que identifica a hora adequada de mudar o formato de triagem de *minipool* (formato menos sensível e mais econômico) para testes individuais (formato mais sensível e dispendioso) (Custer, B. 2004), aumentando para 15 o número de dias da janela para detecção do VON e evitando assim possíveis transmissões transfusionais.

Como só testamos estas amostras em *minipool* e obtivemos resultados negativos não significa que estes doadores nunca tiveram contato com este agente viral, ou ainda que não possuam o vírus, mas apenas que estavam abaixo do limite de detecção do teste. Para podermos afirmar que os indivíduos realmente não tiveram contato seria necessário realizar um estudo sorológico para o VON destas amostras, onde se busca em geral anticorpo tipo IgG.

Lavezzo, em 2010, relatou resultados muito semelhantes em um estudo parecido com este trabalho, no qual procurou 15 tipos diferentes de arbovírus, incluindo o VON, em doadores de sangue. As 205 amostras analisadas por PCR eram provenientes da região Norte (Rio Branco, Pará, Acre e Belém), além de amostras de Tupã – São Paulo. É válido ressaltar que na época deste estudo, a cidade de Tupã passava por um surto de dengue. As amostras provenientes de São Paulo foram analisadas apenas para dengue, enquanto que as outras amostras foram analisadas para os outros 14 Arbovírus (VON, Febre Amarela, Saint Louis vírus, dentre outros), porém todas as amostras foram negativas para todos os agentes virais, inclusive para a dengue.

Em um estudo posterior, a doutoranda de nosso laboratório (IMT-USP) Adriana Tatenó, aplicou às mesmas amostras do HEMOAM uma PCR genérica para Flavivírus. Apenas uma doação foi positiva, e seu sequenciamento revelou tratar-se de uma infecção pelo vírus da dengue de sorotipo 2. Este achado confirma de modo indireto, a ausência do VON e outros Flavivírus aparentados em nossa casuística (dado ainda não publicado).

É pertinente citarmos também o caso ocorrido na região da Andaluzia na Espanha em Setembro de 2010. Naquele ano ocorreu um surto de VON, onde 51 de 102 cavalos sintomáticos para febre do Nilo apresentaram IgM positivo para o VON, sendo que apenas 1 dos 51 cavalos apresentou amplificação positiva do soro e LCR por PCR em tempo real (Garcia-Bocanegra, 2011). Neste mesmo ano na Espanha, também foram identificados casos em humanos. Após o ingresso do primeiro paciente com suspeita de infecção por VON em um hospital da região de Andaluzia, uma vigilância ativa, com a inclusão do VON no diagnóstico diferencial para casos de meningoencefalites humana, foi iniciada ainda no mês de Setembro. Uma semana após este fato, o primeiro caso foi confirmado e um dia após esta confirmação um segundo paciente com suspeita de infecção por VON surge. No início do mês de outubro, medidas de precaução foram adotadas para evitar uma possível transmissão transfusional naquela região. Estas medidas continham diretrizes como: a exclusão de doadores que estiveram em regiões de alto risco nos últimos 28 dias, evitar o uso de doações realizadas na região de risco (regiões onde cavalos ou casos humanos foram relatados), introdução do NAT para o VON e quarentena de todos os hemoderivados de doações ocorridas após 1 de setembro nas regiões de risco até a realização retrospectiva do NAT para este agente etiológico, assim como o teste NAT para todos os órgãos, tecidos e sangue de cordão. É

válido lembrar que a metodologia utilizada para o NAT foi à mesma utilizada nesta dissertação. Estas medidas foram mantidas até o final de dezembro de 2010, cerca de 1 mês após o último caso em cavalo ser diagnosticado. Durante estes três meses foram analisadas 10.768 amostras da região de risco para infecção por VON na Espanha, sendo que 10.341 foram doações de sangue, 232 testes em tecidos e 195 de sangue de cordão. Das 10.341 amostras de doação, 9.748 foram da região de Cadíz, onde 37 cavalos foram detectados com o VON, levando oito destes animais a óbito. Na região de Málaga, onde um caso de VON foi descrito em equino, foram analisadas 427 doação de sangue e na região da Sevilha, onde cinco casos em equinos foram identificados, 195 amostra de doadores foram analisadas. Apesar de estas amostras estarem muito próximas a focus de VON, nenhuma doação de sangue, tecido ou sangue de cordão foram identificadas positivamente. Estes dados, que foram apresentados no Congresso Regional da Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue, realizado em Lisboa-Portugal, pelo Dr. Salvador Oyonarte Gómez, reforçam os nossos resultados, pois mesmo em uma região com transmissão ativa e dezenas de casos de VON em equinos e alguns em humanos, não foi possível detectar qualquer doação positiva em uma casuística maior que a nossa.

Porém se levarmos em consideração o índice de doações positivas de 1 / 147 para VON nos estados do Kansas e Nebraska, nos Estados Unidos, em 2003 (Stramer 2005), poderíamos argumentar que o nosso número amostral seria mais que suficiente para encontrar um indivíduo portador do VON. Mas sabemos também, que a epidemia americana é muito contrastante com o que ocorre no resto do mundo, principalmente na América Latina, já que pouquíssimos casos foram realmente relatados nesta região.



O único caso em que foi realmente identificado o VON na América do Sul ocorreu na Argentina em 2006 (Morales, 2006), por crescimento do vírus em cultura celular proveniente de tecido de biópsia cerebral *postmortem* de um equino.

No Brasil, foram identificadas, até o presente momento, nove amostras soropositivas para o VON, sendo cinco delas publicadas no trabalho de Pauvolid-Corrêa em 2011 e quatro delas em trabalho apresentado no evento FAMERP-UTMB pela pesquisadora Tatiane Ometto. Contrastando com o ocorrido na Espanha em 2010 (Garcia-Bocanegra, 2011), as amostras brasileiras coletadas de cavalos na região do Pantanal, algumas inclusive com sorologia positiva, não obtiveram amplificação por PCR do vírus provenientes dos soros nem das amostras de biópsia cerebral de cavalos com meningoencefalites de etiologia desconhecida. Sabe-se que os sinais clínicos da encefalite por VON em equinos são difíceis de diferenciar de outros sinais clínicos causados por outros agentes etiológicos, como Herpesvirus Equino 1, Raiva, Encefalite Equina do Leste, dentre outras (Epp, 2007; Nelson, 2004). É interessante também lembrar o estudo realizado na França, onde 72 cavalos com suspeita de encefalite equina causada por VON, apenas 33 (44%) foram realmente diagnosticados com esta infecção, além disso, o VON era sabidamente circulante naquela região e um agente comum para este tipo de enfermidade em cavalos (Leblond, 2007).

Levando em consideração o tamanho amostral de amostras soropositivas, o trabalho espanhol (Garcia-Bocanegra, 2011) apresentou apenas 1 amplificação positiva para VON na PCR em tempo real dentre 51 amostras soropositivas, o que representa apenas 1,9 %. Isso poderia até sugerir que o número amostral de equinos soropositivos foi reduzido para uma taxa muito

baixa de amplificação. Podemos citar além disso o caso ocorrido no Rio de Janeiro em 2010, onde uma possível identificação do VON no LCR de um paciente foi proposta, porém testes confirmatórios posteriores identificaram uma reação cruzada com um outro agente etiológico, a dengue (Soares, CN, 2010), o qual é muito comum no Estado carioca.

Levando em consideração a segunda ótica, uma explicação plausível para o fato de não identificar cavalos soropositivos com doença ou sequelas da infecção por VON no Brasil seria o fato do país possuir uma grande diversidade de Flavivírus. Estes animais provavelmente já sofreram alguma infecção anterior por agentes etiológicos da mesma família do Flavivírus e por isso possuíam algum tipo de proteção imune cruzada. Isto poderia ocorrer porque no Brasil, cerca de onze Flavivírus já foram identificados, sendo eles: todos os sorotipos de dengue (1, 2, 3 e 4), vírus da Febre Amarela, vírus de Ilhéus, vírus Rocio, vírus Cacipacore, vírus Bussuquara, vírus Iguape e vírus da Encefalite de Saint Louis (Figueiredo, 2007). É válido lembrar que o vírus da Encefalite de Saint Louis, o vírus Rocio e o VON fazem parte do mesmo sorocomplexo, o da Encefalite Japonesa. Além disso, já foi demonstrado que a prévia inoculação de um hamster com Flavivírus do sorocomplexo de Encefalite Japonesa, protegia estes animais contra a tentativa de infecção posterior com VON (Tesh, 2002).

Sendo assim, expandindo esta teoria de proteção imune cruzada também para as aves, que são os reservatórios naturais deste agente, dificultaria mais ainda a introdução do VON no Brasil e enfraqueceria a teoria da introdução do VON por aves migratórias. Para reforçar ainda mais esta possível hipótese, a pesquisadora Tatiana Ometto, testou 478 amostras de aves coletadas da região amazônica e matogrossense e outras, entre 2008 e 2010, tanto por metodologia sorológica, PRNT, quanto por PCR específico para o VON (Ometto TL, 2010),

porém não conseguindo achar nenhuma amostra reativa. Além deste caso, um inquérito sorológico em aves desenvolvido no Brasil em 1994, apontou uma soropositividade maior ao vírus da encefalite de Saint Louis do que outros Flavivírus (Ferreira, 1994), dificultando ainda mais a introdução do VON por aves, já que estas apresentaram maior contaminação por flavivírus do mesmo sorocomplexo, possibilitando talvez uma reação imune cruzada.

Reconhecemos que a metodologia aplicada neste trabalho não seria a mais indicada para um trabalho de vigilância epidemiológica, sendo a sorologia por IgG uma técnica mais indicada para este tipo de estudo. Porém como o Brasil possui muitos Flavivírus (Figueiredo, 2007), poderia acarretar diversos falsos positivos para o VON, já que reações sorológicas cruzadas são comuns na sorologia para Flavivírus. Podemos citar o trabalho da Fiocruz de Pauvolid-Corrêa, 2011 como exemplo, uma vez que foram detectadas 93 amostras soropositivas para Flavivírus a partir 168 amostras de cavalos, o que representou 55% das amostras analisadas por metodologia ELISA. Após isso, utilizando PRNT, detectaram-se apenas 5 (3%) amostras de VON, 9 (5,4%) de vírus da encefalite de Sant Louis, 18 (10,7%) de vírus Ilhéus e 3 (1,8%) de vírus Cacipacore. As outras 58 amostras restantes, 56 foram consideradas soropositivas para Flavivírus indeterminado e duas amostras foram consideradas soronegativas. Além disso, soropositividades maiores que 50% já foram relatadas em locais onde ocorreram epidemias por Flavivírus (Epp, 2007). No Brasil, onde inquéritos sorológicos buscando Flavivírus em equinos é raro, alguns trabalhos apresentaram taxas de soropositividade superior a 25% para Flavivirus em equinos (Iversson, 1993). O trabalho de Rodrigues em 2010 também identificou uma prevalência de 44,8% para flavivírus em equinos na região do Pantanal, região esta igual à utilizada na amostragem de equinos

desta dissertação. Já em relação às amostras em humanos, em 2007 um surto do vírus da encefalite de Saint Louis ocorreu no interior do estado de São Paulo, concomitantemente a um surto de Dengue, o que ocasionou diversos diagnósticos errados (Mondini 2007).

Por causa deste alto índice de flavivirose no Brasil, muitas vezes acarretando reações cruzadas, todos os resultados de sorologia necessitariam de um teste confirmatório direto para o VON, neste caso uma PCR ou uma cultura viral, para a real confirmação da introdução do VON no País. O isolamento do vírus pelo crescimento em cultura de células é difícil, sendo necessária grande quantidade de amostra e preferencialmente fresca e os resultados só são considerados positivos quando se observa o efeito citopático em células Vero. O isolamento do VON pode demorar de três a sete dias, dependendo da quantidade de vírus presente na amostra (Pealer, 2003). Apesar de termos evidências sorológicas que o VON tenha sido introduzido no Brasil (Pauvolid-Corrêa 2011; Ometto TL, 2010) nenhuma evidência confirmatória do vírus ainda foi achada, nem por amplificação do RNA viral ou amplificação de partículas virais em cultura celular.

Como foi dito antes, apesar de termos apresentado um resultado confortante, é importante manter as investigações epidemiológicas ativas tanto em aves, mosquitos e mamíferos, para que não ocorra o que ocorreu nos EUA e isto não vire um grande problema de saúde pública, podendo chegar até ao comprometimento dos estoques de sangue dos bancos de sangue.

Como o VON é transmitido por diversos tipos de mosquitos, inclusive os mesmos do da dengue, a manutenção de inquéritos epidemiológicos para estes vetores não seria algo muito laborioso para implantação, pois já existem

similares para a dengue. Além disto, os equinos por serem altamente suscetíveis à infecção pelo VON e desenvolverem sinais clínicos com mais frequência que os humanos, podem ser utilizados para o monitoramento da circulação deste agente etiológico e predizer possíveis surtos na população humana (Leblond, 2007; Ward, 2008).

Embora o VON não tenha sido detectado diretamente pela metodologia aplicada neste trabalho, existem indícios que isso poderá ocorrer eventualmente, uma vez que já foram identificadas evidências indiretas da circulação do VON no Brasil. Caso isso ocorra, é muito importante ter um plano de ação imediato para assegurar que o País não perca o controle deste surto. Caso isto ocorra a tecnologia utilizada neste trabalho se mostrará muito útil, pois possibilitará uma varredura rápida e eficiente para os bancos de sangue, ou até mesmo para um possíveis diagnósticos.

## 6. Conclusão

Não se encontrou evidência molecular de indivíduos com infecção aguda pelo VON no Brasil, testando-se amostras de doadores de sangue de regiões fortemente candidatas a albergarem o VON por apresentarem condições ecológicas propícias. Amostras de líquido e de soro e tecido cerebral de equinos também foram negativas, corroborando os achados em doadores. No entanto, por sua enorme repercussão transfusional e de saúde pública, deve ser mantida e expandida a vigilância para este agente, estendendo-se também para os seus vetores entomológicos e reservatórios ornitológicos.

## REFERÊNCIAS

- Adrián Diaz L, Komar N, Visintin A, Dantur Juri MJ, Stein M, Lobo Allende R, et al. West Nile Virus in Birds, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2008 Apr;14(4):689-91.
- Bernard KA, Maffei JG, Jones AS, Kauffman EB, Ebel GD, Dupuis II AP, et al. West Nile Virus infection in birds and mosquitoes, New York State 2000. *Emerg Infect Dis.* 2001 Jul-Aug; 7:679-85.
- Biggerstaff BJ, Petersen LR. Estimated risk of West Nile virus transmission through blood transfusion during an epidemic in Queens, New York City. *Transfusion.* 2002 Aug;42:1019-26.
- Brinton MA. The molecular biology of West Nile virus: a new invader of the western hemisphere. *Annual Rev Microbiol,* 2002: 56:371.
- Burke DS, Monath TP. Flaviviruses. In *Fields Virology*, by Williams & Wilkins Lippincott, 1043–125. Philadelphia, 2001.
- Busch MP, Stramer SL. Viremia and antibody studies in WNV infected blood donors. *CDC.* [www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/conf/February\\_2005.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/conf/February_2005.htm). (accessed July 8, 2005).
- Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. West Nile virus. *Lancet Infect Dis,* 2002: 2:519-29.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National Center for Infectious Diseases, Division of Vector-Borne Infectious Diseases, Fort Collins, Colorado, 3rd Revision. Epidemic/Epizootic West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance prevention and control. 2003.78p.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: West Nile virus screening of blood donation and transfusion-associated transmission - United States, 2003. *MMWR* 53 (2004): 281-4.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). West Nile Activity – United States, September 5-11, 2002, and Texas, January 1-September 9, 2002. *MMWR,* 2002: 51(36):812-823.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of West Nile-like viral encephalitis – New York, 1999. *MMWR,* 1999(a): 48(38):845.

- Chin, J. Control of communicable diseases manual. Washington: American Public Health Association; ed 17: 2000. 624p.
- Communicable Diseases Program, PAHO's Division of Disease Prevention and Control (HCP/HCT). Guidelines for surveillance prevention and control of West Nile Virus. *Epidemiol Bull.* 2002 Dec;23(4):12-4.
- Custer B, Kamel H, Kiely NE, Murphy EL, Busch MP. Associations between West Nile virus infection and symptoms reported by blood donors identified through nucleic acid test screening. *Transfusion* 2009; 49:278–288.
- Custer B, Tomasulo PA, Murphy EL, Caglioti S, Harpool D, Patrick McEvoy, et al. Triggers for switching from minipool testing by nucleic acid technology to individual-donation nucleic acid testing for West Nile virus: Analysis of 2003 data to inform 2004 decision making. *Transfusion* 44 (2004): 1547-54.
- Epp T, Waldner C, West K, Townsend H. Factors associated with West Nile virus disease fatalities in horses. *Can Vet J.* 2007 Nov;48(11):1137-45.
- Expedito JAL; Pereira LE, Souza RP. West Nile Encephalitis, our next epidemic? *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 2003;12(1):7-19.
- Ferreira IB, Pereira LE, Rocco IM, Marti AT, de Souza LT, Iversson LB. Surveillance of arbovirus infection in the Atlantic Forest region, State of São Paulo Brazil – I. Detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1978-1990. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1994 May-Jun;36(3):265-74.
- Figueiredo LT. Emergent arboviruses in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007 Mar-Apr;40(2):224-9.
- Food and Drug Administration (FDA) Code of Federal Regulations. Guidance for Industry: Assessing Donor Suitability and Blood and Blood Product Safety in Cases of Known or Suspected West Nile Virus Infection. *FDA.* Jun 2005.
- Gandelman-Martón R, Kimiagar I, Itzhaki A, Klein C, Theitler J, Rabey JM. Electroencephalography finding in adult patients with West Nile virus-associated meningitis and meningo-encephalitis. *Clin Infect Dis.* 2003 Dec 1;37(11):1573-8.
- García-Bocanegra I, Jaén-Téllez JA, Napp S, Arenas-Montes A, Fernández-Morente M, Fernández-Molera V, et al. West Nile Fever Outbreak in Horses and Humans, Spain, 2010. *Emerg Infect Dis.* 2011 Dec;17(12):2397-9.



- Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL. Epidemiology and Transmission Dynamics of West Nile Virus Disease. *Emerg Infect Dis.* 2005 Aug;11(8):1167-73.
- Hubalek Z, Halouzka J. West Nile Fever – a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis.* 1999 Sep-Oct;5(5):643-50.
- Ilkal MA, Mavale MS, Prasanna Y, Jacob PG, Geevarghese G, Banerjee K. Experimental studies on the vector potential of certain *Culex* species to West Nile virus. *Indian J Med Res.* 1997 Sep;106:225-8.
- Iversson LB, Silva RA, da Rosa AP, Barros VL. Circulation of eastern equine encephalitis, western equine encephalitis, Ilhéus, Maguari and Tacaiuma viruses in equines of the Brazilian Pantanal, South America. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1993 Jul-Aug;35(4):355-9.
- Iwamoto M, Jernigan DB, Guasch A, Trepka MJ, Blackmore CG, Hellinger WC, Pham SM, et al. Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med.* 2003 May 29;348(22):2196-203.
- Johnson DJ, Ostlund EN, Pedersen DD, Schmitt BJ. Detection of North American West Nile virus in animal tissue by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction. *Emerg Infect Dis.* 2001 Jul-Aug;7(4):739-41.
- Jupp, P G. The ecology of West Nile virus in South Africa and the occurrence of outbreaks in humans. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Dec;951:143-52.
- Kitaoka, M. 1950. Experimental transmissions of the West Nile virus by the mosquito. *Jpn Med J (Natl Inst Health Jpn).* 1950 Apr;3(2):77-81.
- Kulasekera VL, Kramer L, Nasci RS, Mostashari F, Cherry B, Trock SC, et al. West Nile Virus infection in mosquitoes, birds, horses, and human, Staten Island, New York 2000. *Emerg Infect Dis.* 2001 Jul-Aug;7(4):722-5.
- Lanciotti RS, Kerst AJ. Nucleic acid sequence based amplification assays for rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viruses. *J Clin Microbiol.* 2001 Dec;39(12):4506-13.
- Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsey MS, Mitchell CJ, Savage HM, et al. Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2000 Nov;38(11):4066-71.
- Laperche S. Blood safety and nucleic acid testing in Europe. *Euro Surveill.* 2005 Feb;10(2):3-4.

- Lateef A, Fisher DA and Tambyah PA. West Nile Virus, Venezuela. *Emerg Infect Dis*, 2007: Vol. 13, No. 4, April 2007.
- Lavezzo LC, Dos Santos Santana V, Terzian AC, Mondini A, de Moraes Bronzoni RV, Sperança M, et al. Arboviruses in blood donors: a study in the Amazon region and in a small city with a dengue outbreak. *Transfus Med*. 2010 Aug 1;20(4):278-9.
- Leblond A, Hendrikx P, Sabatier P. West Nile virus outbreak detection using syndromic monitoring in horses. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2007 Fall;7(3):403-10.
- Levi JE, Contri DG, Lima LP, Takaoka DT, Garrini RH, Santos W, et al. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA among Brazilian blood donors. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003 Mar-Apr;45(2):75-8.
- Marfin AA, Gubler DJ. West Nile Encephalitis: an emerging disease in the United States. *Clin Infect Dis*. 2001 Nov 15;33(10):1713-9.
- Mattar S, Edwards E, Laguado J, Gonzalez M, Alvarez J, Komar N. West Nile virus infection in Colombian horses. *Emerg Infect Dis*. 2005 Sep;11(9):1497-8.
- Melnick JL, Paul JR, Riordan JT, Barnett VH, Goldblum N, Zabin E. Isolation from Human Sera in Egypt of a Virus Apparently Identical to West Nile Virus. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1951 Aug;77(4):661-5.
- Mondini A, Cardeal IL, Lázaro E, Nunes SH, Moreira CC, Rahal P, et al. Saint Louis encephalitis virus, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2007 Jan;13(1):176-8.
- Morales MA, Barrandeguy M, Fabbri C, Garcia JB, Vissani A, Trono K, et al. West Nile Virus Isolation from Equines in Argentina. *Emerg Infect Dis*. 2006 Oct;12(10):1559-61.
- Nash D, Mostashari F, Fine A, Miller J, O'Leary D, Murray K, et al. The Outbreak Of West Nile Virus Infection in The New York City Area in 1999. *N Engl J Med*. 2001 Jun 14;344(24):1807-14.
- Nelson DM, Gardner IA, Chiles RF, Balasuriya UB, Eldridge BF, Scott TW et al. Prevalence of antibodies against Saint Louis encephalitis and Jamestown Canyon viruses in California horses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004 May;27(3):209-15.
- Nelson KE, Masters-Williams C, Graham NMH. *Infectious Diseases Epidemiology – Theory and Practice*. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2001.
- NIH. Scientists Show that Tick-Borne Flaviviruses Use a Novel Mechanism to Evade Host Defenses. September 28, 2005. (accessed February 28, 2008).

- Ometto TL, Durigon EL, Araujo J, Aprelon A, Moura de Aguiar D, Cavalcante GT et al Surveillance of West Nile Virus in Brazil evento FAMERP-UTM São José do Rio Preto 2010.
- Oyonarte S. ISBT Working Party in Transfusion Transmitted Infections (WP-TTI) meeting, Lisbon 2011.
- Pauvolid-Corrêa A, Morales MA, Levis S, Figueiredo LT, Couto-Lima D, Campos Z, et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Jun;106(4):467-74.
- 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. *N Engl J Med*. 2003 Sep 25;349(13):1236-45.
- Pereira LE, Suzuki A, Souza RP, Souza MFCG, Flauto G. Sazonalidade das populações de *Vireo olivaceus* (Linnaeus, 1766) (Aves, Vireonidae) em regiões da Mata Atlântica do Estado de São Paulo, Brasil. *Ararajuba*, Dez 1998; 6(2):117-122.
- Petersen LR, Roehrig JT, Hughes JM. West Nile virus encephalitis. *N Engl J Med*. 2002 Oct 17;347(16):1225-6.
- Petersen LR, Marfin AA. West Nile Virus: a primer for the clinician. *Ann Intern Med*. 2002 Aug 6;137(3):173-9.
- Petersen LR, Roehrig JT. West Nile Virus: a reemerging global pathogen. *Emerg Infect Dis*. 2001 Jul-Aug;7(4):611-4.
- Petersen LR, Bush MP. Transfusion-transmitted arboviruses. *Vox Sang*. 2010 May;1998(4):495-503.
- Rappole JH, Derrickson SR, Hubálek Z. Migratory birds and spread of West Nile Virus in the Western Hemisphere. *Emerg Infect Dis*. 2000 Jul-Aug;6(4):319-28.
- Rice, C.M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, 931–959. 1996.
- Rios M, Daniel S, Chancey C, Hewlett IK, Stramer SL. West Nile Virus Adheres to Human Red Blood Cells in Whole Blood. *Clin Infect Dis*. 2007 Jul 15;45(2):181-6.
- Rodrigues SG, Oliva AP, Araujo FAA, Martins LC, Chiang JO, Henriques DF, et al. Epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon region and in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil: elevated

prevalence of antibodies in horses *Revista Pan-Amaz Saude*,2010;1(1):81-86

- Savage HM, Ceianu C, Nicolescu G, Karabatsos N, Lanciotti R, Vladimirescu A, et al. Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Oct;61(4):600-11.
- Sick, H. *Ornitologia Brasileira*. Edição revista e ampliada por J. F. Pacheco. Rio de Janeiro: Nova Fronteira. 1997.
- Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med.* 1940 Jun;20:471-92.
- Soares CN, Castro MJ, Peralta JM, Freitas MR, Puccioni-Sohler M. Is West Nile virus a potential cause of central nervous system infection in Brazil? *Arq Neuropsiquiatr.* 2010 Oct;68(5):761-3.
- Solomon T, Ooi MH, Beasley DW, Mallewa M. West Nile Encephalitis. *BMJ.* 2003 Apr 19;326(7394):865-9.
- Southam CM, Moore AE. Induced virus infections in man by the Egypt isolates of West Nile virus. *Am J Trop Med Hyg.* 1954 Jan;3(1):19-50.
- Stotz D, Bierregaard FR, Cohn-Hhaft M, Petermann M, Smith J, Whittaker A, Wilson SV. The Status of North American migrants in Central Amazonian Brazil. *Condor* , 1992 Aug;94:608-621.
- Stramer SL, Brodsky JP, Dodd RY, et al. Dynamics of WNV infection and resolution among blood donors. Presented at the Sixth National Conference on West Nile Virus in the United States. 2005: 8-9.
- Stramer SL, Fang CT, Foster GA, Wagner AG, Brodsky JP, Dodd RY. West Nile Virus among Blood Donors in the United States, 2003 and 2004. *N Engl J Med.* 2005 Aug 4;353(5):451-9.
- Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM, Kleinman S, Metzel PS, Gregory KR, et al. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion.* 2009 Aug;49 Suppl 2:1S-29S.
- Tesh RB, Travassos da Rosa AP, Guzman H, Araujo TP, Xiao SY. Immunization with heterologous flaviviruses protective against fatal West Nile encephalitis. *Emerg Infect Dis.* 2002 Mar;8(3):245-51.
- Turell MJ, O'Guinn M, Oliver J. Potential for New York mosquitoes to transmit West Nile virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2000 Mar;62(3):413-4.

- Tyler, K. West Nile Virus Encephalitis In America. *N Engl J Med.* 2001 Jun 14;344(24):1858-9.
- Ward MP, Scheurmann JA. The relationship between equine and human West Nile virus disease occurrence. *Vet Microbiol.* 2008 Jun 22;129(3-4):378-83.
- Wendel S, Levi JE. Dengue in blood donors. Do we needlaboratorial screening? *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2008;30(5):417-422.
- Wendel S, Levi JE, Takaoka DT, Silva IC, Castro JP, Torezan-Filho MA, et al. Primary Screening of Blood Donors By NAT Testing For HCV-RNA: Development of an In-House Method and Results. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2007 May-Jun;49(3):177-85.

## ANEXO A – TCLE HEMOAM / AM

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – HEMOAM / AM

**TÍTULO DO ESTUDO:** Pesquisa sentinela da Introdução do vírus do Oeste do Nilo no Brasil pela análise de doadores de sangue da Amazônia.

**JUSTIFICATIVA/OBJETIVOS:** O estudo irá contribuir para uma possível descoberta da introdução do vírus do Oeste do Nilo na população de doadores de sangue do Amazonas.

**PROCEDIMENTOS:** Para este estudo será coletado uma amostra de 5 mL de sangue. Serão feitos testes para verificar a presença do vírus. Alguns destes testes serão feitos no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e posteriormente serão realizados na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM.

**RISCOS E DESCONFORTOS:** Não existem riscos associados à participação deste estudo. O único desconforto é a picada da agulha.

**BENEFÍCIOS:** Como as amostras serão analisadas para o vírus do Oeste do Nilo **vários meses após a coleta**, não será possível notificá-lo, caso se descubra que na época da doação o Sr.(a) estava infectado. Como a dengue, essa é uma infecção curta, que se resolve em cerca de três semanas. Desta forma, sua participação lhe trará apenas benefícios indiretos, mas ajudará no conhecimento da possível introdução do vírus do Oeste do Nilo no Brasil. Mesmo assim, caso verifique-se que a sua amostra continha o vírus do oeste do Nilo, o Sr.(a) será convocado pelo HEMOAM e orientado (ver abaixo acompanhamento assistencial)

**ACOMPANHAMENTO ASSISTENCIAL:** Caso o indivíduo seja positivo para o vírus, esse será notificado e encaminhado para o acompanhamento pelo sistema de saúde pública do Estado do Amazonas. Os casos serão reportados para a Fundação de vigilância em Saúde do Estado do Amazonas e Instituições competentes.

**VOLUNTARIEDADE:** A participação neste estudo é voluntária. Os participantes deste estudo podem retirar sua participação a qualquer momento, sem que isso atrapalhe o seu atendimento no HEMOAM.

**CONFIDENCIALIDADE, PRIVACIDADE E ANONIMATO:** Os dados pessoais referentes à participação dos indivíduos neste estudo permanecerão confidenciais, não sendo divulgados de forma a declarar identidade dos participantes.

**USO DE MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO:** O material biológico coletado (sangue periférico) será utilizado somente para o que se propõe neste estudo e será armazenado para estudos posteriores sobre este vírus do Oeste do Nilo, ou outros vírus semelhantes que podem ser descobertos na sua amostra, sempre após a aprovação do comitê de ética em pesquisa do HEMOAM, conforme a Resolução N° 347/2005.

### CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido informações claras, eu concordo em participar do estudo em questão.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do participante)

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do pesquisador)



(impressão dactiloscópica)

## ANEXO B – TCLE HC / SP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – HOSPITAL DAS CLÍNICAS / SP

### HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

#### MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: :.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº

..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE

.....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

.....

2. RESPONSÁVEL ..... LEGAL

.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO:

.....

BAIRRO: ..... CIDADE:

.....

CEP: ..... TELEFONE: DDD

(.....).....

#### DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **PESQUISA SENTINELA DA  
INTRODUÇÃO DO VÍRUS DO OESTE DO NILO NO BRASIL PELA ANÁLISE  
DE DOADORES DE SANGUE DA AMAZÔNIA**

PESQUISADOR : JOSÉ EDUARDO LEVI

CARGO/FUNÇÃO: PESQUISADOR. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL (CRBio) Nº .23.407/01-D.....

UNIDADE DO HCFMUSP:  
.....

### 3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO  RISCO MÉDIO   
RISCO BAIXO  RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos.

### 1 – Desenho do estudo e objetivo(s):

A Sr(a). está sendo convidado a participar de um estudo sobre a introdução do vírus do Oeste do Nilo no Brasil pela análise de doadores de sangue da Amazônia. Esse estudo contribuirá para uma possível descoberta sobre a introdução desse novo vírus no território brasileiro.

Para poder efetuar este estudo precisamos investigar doadores de sangue de todo o estado da Amazonas, por sua proximidade com países como Colômbia e Venezuela, onde esse vírus já foi identificado. É um vírus que pode ser muito nocivo aos receptores de transfusões de sangue, embora o doador possa ser saudável e daí vêm a importância de monitorar a entrada do mesmo em nosso país.

### 2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros:

Para verificar a presença do vírus do oeste do Nilo, faremos um teste experimental em 20.000 doações colhidas no Hemoam por um período de cerca de 6 meses. Precisaremos de um tubo de sangue de 5 mL adicional ao que já é coletado de rotina na doação.

### 3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados:

O procedimento de rotina para a coleta de sangue é, após a entrevista de triagem e a aprovação, o doador fica sentado na cadeira de doação. A equipe do banco de sangue realiza a limpeza da região do braço onde será feita a punção com a agulha. Uma vez puncionado, são coletados 4 tubos de sangue para as análises de rotina e por último a bolsa de sangue. Nesse caso serão 5 tubos ao invés de 4 (um a mais), porém não é necessário realizar nova punção, pois a mesma agulha serve para a coleta dos tubos e da bolsa.

### 4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3;

Os desconfortos e riscos são aqueles associados à doação de sangue, dos quais o sr.(a) já foi informado pela equipe do banco de sangue.



## **5 – Benefícios para o participante**

Como as amostras serão analisadas para o vírus do Oeste do Nilo vários meses após a coleta, não será possível notificá-lo, caso se descubra que na época da doação o Sr.(a) estava infectado. Como a dengue, essa é uma infecção curta, que se resolve em cerca de três semanas. Desta forma, sua participação lhe trará apenas benefícios indiretos, mas ajudará no conhecimento da possível introdução do vírus do Oeste do Nilo no Brasil. Mesmo assim, caso verifique-se que a sua amostra continha o vírus do oeste do Nilo, o Sr.(a) será convocado pelo HEMOAM e orientado (ver abaixo acompanhamento assistencial)

## **6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar;**

## **7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo,**

Você terá livre acesso a todas informações relativas a esta pesquisa e à sua participação nela, em qualquer momento que desejar. Você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. José Eduardo Levi – Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, que pode ser encontrado no endereço Rua Dr Enéas de Carvalho Aguiar 470, 2º andar, Lab. de Virologia do IMT-SP Telefone(s) fone 11 3062 2645 e-mail : [dudilevi@usp.br](mailto:dudilevi@usp.br)

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: [cappesq@hcnet.usp.br](mailto:cappesq@hcnet.usp.br)

## **8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição:**

Sua decisão de abandonar o estudo em qualquer momento, não implicará em qualquer alteração na qualidade de seu atendimento médico.

## **09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente:**

Os dados desta pesquisa serão mantidos em sigilo, sendo disponíveis apenas para o próprio paciente, o médico lhe assistindo e os pesquisadores envolvidos.

**10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores:**

O Sr.(a) tem direito de ser mantido atualizado dos resultados parciais das pesquisas e dos resultados finais, bastando para isso contactar o pesquisador e/ou as instituições envolvidas.

**11 – Despesas e compensações:**

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

O material biológico coletado (sangue periférico) será utilizado somente para o que se propõe neste estudo e será armazenado para estudos posteriores sobre este vírus do Oeste do Nilo, ou outros vírus semelhantes que podem ser descobertos na sua amostra, sempre após a aprovação do comitê de ética em pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **PESQUISA SENTINELA DA INTRODUÇÃO DO VÍRUS DO OESTE DO NILO NO BRASIL PELA ANÁLISE DE DOADORES DE SANGUE DA AMAZÔNIA**. Eu discuti com o Dr. José Eduardo Levi sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

-----  
Assinatura do paciente/representante  
legal

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

-----  
Assinatura da testemunha

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

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

*(Somente para o responsável do projeto)*

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

-----

Assinatura do responsável pelo estudo    Data     /     /