



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL

FILIPE ALMEIDA CARVALHO GONZAGA

**PREVALÊNCIA DOS VÍRUS ZIKA E DENGUE EM DOADORES DE SANGUE DO DISTRITO FEDERAL**

BRASÍLIA

2018

FILIPPE ALMEIDA CARVALHO GONZAGA

PREVALÊNCIA DOS VÍRUS ZIKA E DENGUE EM DOADORES DE  
SANGUE DO DISTRITO FEDERAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Haddad

Co-orientador: Profa. Dra. Doralina do Amaral Rabello Ramos



BRASÍLIA

2018

PREVALÊNCIA DOS VÍRUS ZIKA E DENGUE EM DOADORES DE  
SANGUE DO DISTRITO FEDERAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Aprovado em 31 de Julho de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Haddad (Presidente)

Prof. Dr. Antonio Ricardo Khouri Cunha

Prof. Dr. Wildo Navegantes de Araújo

Prof. Dra. Thais Alves da Costa Lamounier (Suplente)

Ao meu avô Vicente Luis Gonzaga *In memoriam*, por ter sido meu exemplo de vida e por ter me ensinado que o sucesso é consequência do trabalho, da dedicação e do vencimento de barreira.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, pela oportunidade.

Registro aqui meu profundo e sincero agradecimento ao professor Dr. Rodrigo Haddad. Obrigado pela confiança, paciência, orientação e ensinamentos.

À minha co-orientadora, Professora Dra. Doralina do Amaral Rabello Ramos, que foi fundamental para a realização desta pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências, e da Faculdade de Saúde, (Ana Carolina, Drielly, Fábio, Bruno, Evelin) pelo total suporte e apoio.

À Professora Dra. Daiani Cristina Cilião Alves pela ajuda, ensinamentos e o tempo dedicado.

Aos colaboradores da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, em especial ao Dr. Svetoslav Nanev Slavov e Dra. Simome Kashima.

Um agradecimento especial para a Bárbara Pimentel e os demais servidores da Fundação Hemocentro de Brasília (FHB) e a Grasielle e Fabiano do Laboratório Central por me auxiliarem sempre com cortesia e prestatividade.

Aos meus pais: Francisco e Raquel, e minha namorada Natani por compreenderem as minhas ausências.

Enfim, meu muito obrigado a todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

"Para quem não sabe aonde vai  
Qualquer caminho serve."  
Cheshire Cat

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Testes de detecção para agentes infecciosos.

**Tabela 2.** Descrição dos conjuntos de primer e sonda.

**Tabela 3.** Caracterização da população objeto de estudo.

**Tabela 4.** Resultados das amostras consideradas inconclusivas obtidos por MAC–ELISA para YFV, ZIKAV e DENV.

**Tabela 5.** Comparação da prevalência de DENV por diferentes testes.

**Tabela 6.** Comparação da prevalência de ZIKAV.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Modelo de ciclo de transmissão dos Flavivirus, mais especificamente do ZIKAV (Petersen LR et al. N Engl J Med 2016;374:1552-1563).

**Figura 2.** Visualização do comportamento biológico da infecção por DENV. (Muller et al. J Infect Dis. 2017;215(suppl 2):S89-S95).

**Figura 3.** Estratégia experimental do estudo.

**Figura 4.** Imagem do software QuantStudio™ 3 and 5 Firmware v1.3.3 proveniente de uma reação do presente estudo. Nela podemos observar o número do ciclo, o CT, e o platô.

**Figura 5.** Possíveis resultados obtidos na RT-qPCR onde: a) Controle Positivo em Duplicata; b) Controle Negativo em Duplicata; c) Amostra Considerada Duvidosa; e d) Amostra Considerada Negativa.



## **LISTA DE ABREVIACÕES**

**AIDS** - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

**CDC** - Centro de Controle e Prevenção de Doenças.

**cDNA** - DNA Complementar.

**CHKV** - Vírus da Chikungunya.

**CT** - Threshold Cycle.

**DENV** - Vírus da Dengue.

**EIE** - Ensaio Imunoenzimático.

**ELISA** - Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay ou Ensaio de Imunoabsorção Enzimática.

**FHB** - Fundação Hemocentro de Brasília.

**HBV** - Vírus da Hepatite B.

**HCV** - Vírus da Hepatite C.

**HIV** - Vírus da Imunodeficiência Humana.

**HTLV** - Vírus T-linfotrópico Humano.

**IgG** - Imunoglobulina G.

**IgM** - Imunoglobulina M.

**JE**- Encefalite Japonesa.

**LACENDF** - Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal.

**MS** - Ministério da Saúde.

**NAT** – Teste de cido Nucléico.

**NS** - Proteínas Não Estruturais.

**PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase.

**QLM** - Quimioiluminescncia.

**RDC** - Resolução da Diretoria Colegiada.

**RT-PCR** - Reverse Transcriptase Chain Reaction ou Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa.

**SAS** - Secretaria de Atenção Saúde.

**SINAN** - Sistema de Informação de Agravos de Notificação.

**VNO** - Vírus do Nilo Ocidental.

**ZIKAV** – Vírus da ZIKA.

**WHO** - World Health Organization.

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1.** Distribuição dos casos prováveis de dengue em residentes no Distrito Federal, segundo o mês do início dos sintomas, dos anos 2015, 2016 e 2017. Dados retirados do Informativo Epidemiológico de Dengue, Chikungunya e Zika, realizado pela Secretaria de Estado de Saúde do DF.

## ÍNDICE

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1Arboviroses.....	15
1.2Flavivirus.....	15
1.3Dengue.....	17
1.4Zika Vírus.....	19
1.5Segurança transfusional.....	20
1.6Arbovírus e transfusão de sangue.....	24
<b>2.JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>26</b>
<b>3.OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
3.1Objetivo geral.....	27
3.2Objetivos Específicos.....	27
<b>4.METODOLOGIA.....</b>	<b>28</b>
4.1Estratégia Experimental.....	28
4.2Casuística.....	29
4.3Cálculo amostral.....	29
4.4Obtenção das amostras.....	30
4.5ELISA para o antígeno NS1 e IgM de DENV.....	30
4.6ELISA para IgG de Dengue e IgM de Chikungunya.....	30
4.7Ensaio imunoenzimático para captura de anticorpos IgM (Mac-ELISA) para YFV.....	31
4.8RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) para ZIKAV.....	31
4.8.1Extração do RNA.....	31
4.8.2Transcrição Reversa.....	32
4.8.3qRT-PCR.....	32
<b>5.RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
5.1Caracterização das Amostras.....	35
5.2 ELISA para o antígeno NS1 de DENV.....	35
5.3ELISA para o IgM de DENV.....	35
5.4ELISA para o antígeno IgG de DENV.....	36
5.5MAC-ELISA para o antígeno IgM de YFV, DENV e ZIKAV.....	36
5.6ELISA para o antígeno IgM de CHKV4.....	37
5.7RT-qPCR para ZIKAV.....	37
<b>6.DISSCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>7.CONCLUSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>8.ANEXOS.....</b>	<b>46</b>

## RESUMO

No início de 2016 houve um aumento no número de casos DENV quando comparado a anos anteriores no Distrito Federal. Geralmente essas infecções apresentam sintomas suaves e até mesmo assintomáticos, porém a transfusão de hemoderivados em pacientes em estado potencialmente crítico, e que muitas vezes estão imunocomprometidos, pode levar a sintomas mais graves. Como diversas evidências apontam para a transmissão de arbovírus por transfusão sanguínea, torna-se importante a avaliação dos doadores da Fundação Hemocentro de Brasília no intuito de se observar a prevalência do vírus da Zika (ZIKAV) e do vírus da Dengue (DENV), especialmente em um período de alto número de casos reportados na população geral. Para tal, 475 amostras de soro obtidas de doadores de sangue entre Dezembro de 2015 a Maio de 2016 foram testadas para NS1 de DENV e IgM anti-DENV por ELISA, e RT – qPCR para ZIKAV. Nas amostras IgM anti-DENV ou NS1 positivas ou inconclusivas foram realizados testes de Elisa para IgG anti-DENV, IgM anti-CHIKV, e Mac-ELISA para YFV. Quando reagente verificou-se a possibilidade de reações cruzadas, por MAC-ELISA para IgM de ZIKAV e DENV. Não foi observada positividade para o antígeno NS1 em nenhuma das amostras testadas. Aproximadamente 6,95% dos doadores apresentavam o anticorpo de fase aguda IgM para DENV. Parte das amostras que apresentaram resultado positivo para IgM de DENV também possuíam a presença do anticorpo IgG para DENV. Algumas amostras que apresentaram resultado reagente para IgM de DENV também apresentaram resultado reagente IgM de outros flavivírus testados (YFV e ZIKAV). Nenhuma amostra positiva para IgM de DENV apresentou resultado reagente para IgM de CHIKV. Além disso, para fins de comprovação, aquelas amostras que apresentaram reação cruzada entre DENV e ZIKAV foram retestadas por RT-qPCR e mantiveram o resultado negativo para o ZIKAV. Em relação à DENV, de 29 amostras que foram reagentes para IgM, 19 também foram reagentes para IgG, o que pode indicar presença do IgM na ausência do vírus. Além disso, não foi observada positividade para o antígeno NS1 no teste de DENV por ELISA. Porém, é necessário ressaltar a importância do RT-PCR para DENV para diagnóstico confiável.

**PALAVRAS-CHAVE:** Infecções transmitidas pelo sangue; Doenças emergentes; Infecções transmitidas por vetores.

## ABSTRACT

In early 2016 there was an increase in the number of DENV cases in Federal District, Brazil, compared to previous years. These infections usually present mild symptoms or even no symptoms, although the transfusion of blood products in potentially critical patients - commonly immunocompromised - can lead to more serious symptoms. As several evidences point to the transmission of arboviruses by blood transfusion, it's important to evaluate the blood of donors from the Fundação Hemocentro de Brasília in order to observe the prevalence of Zika virus (ZIKAV) and Dengue virus (DENV), specially in a period of high number of cases in general population. For this purpose, 475 serum samples obtained between December 2015 and may 2016 were tested for NS1 of DENV and anti-DENV IgM by ELISA and RT-qPCR for ZIKAV. In positive or inconclusive anti-DENV IgM NS1 samples, ELISA tests were performed for anti-DENV IgG, anti-CHIKV IgM and MAC-ELISA for YFV. When reagent, was found the possibility of cross-reactions by MAC-ELISA for ZIKAV and DENV IgM. Positive results for antigen NS1 was not observed. Approximately 6.95% of the donors presented the IgM acute phase antibody to DENV. Part of the samples that presented positive results for DENV IgM also presented IgG antibody to DENV. Some samples that showed positive results for IgM DENV also showed positiv results for other flaviviruses tested (YFV and ZIKAV). No positive sample for DENV IgM presented positive result for CHKV. In addition, for verification purposes, those samples that showed cross-reaction between DENV and ZIKAV were tested by RT-qPCR and maintained the negative result for ZIKAV. In relation to DENV, 19 samples IgM positive (from 29 tested) were also positive for IgG, which may indicate the presence of IgM in the virus absence. In addition, no positive samples were observed for the NS1 antigen in the DENV test by ELISA. However, it is necessary to emphasize the importane of RT-PCR for DENV for reliable diagnosis.

**KEY WORDS:** Blood-borne infections; emerging diseases; infections transmited by vectors

## 1. INTRODUÇÃO

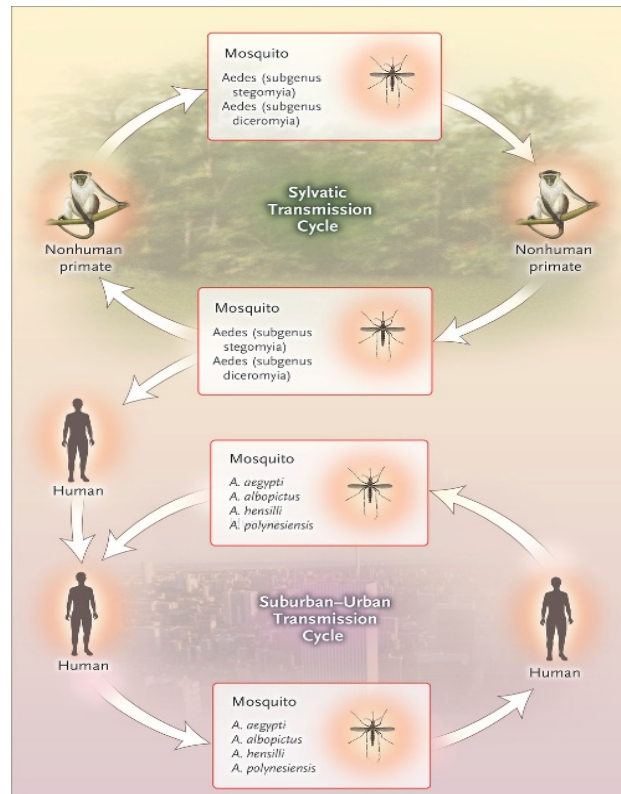
### 1.1 Arboviroses

São denominadas arboviroses doenças causadas por arbovírus, que são vírus transmitidos por artrópodes, mais comumente mosquitos, carrapatos, ácaros, lêndeas e flebotomíneos (Beckham et al., 2015; Veronesi, 1991; Rust, 2012; Lopes, 2014). Nos últimos anos, houve o ressurgimento e/ou surgimento de doenças arbovirais epidêmicas de importância global que afetam seres humanos (Morse, 1995; Gubler, 2002; Mackenzie et al., 2004). Como exemplo destes fatos podemos citar a disseminação e estabelecimento da encefalite japonesa (JE) e vírus do Nilo Ocidental (VNO) em novos habitats e ambientes (Bakonyi et al., 2006; Lanciotti, 1999), o ressurgimento da dengue em áreas tropicais e subtropicais do mundo (Hapuarachchi, 2016) e um surto de Chikungunya na Itália (Rezza et al., 2007). Essas preocupantes tendências epidemiológicas provavelmente continuarão a acontecer nas próximas décadas (Petersen, 2015).

As arboviroses que podem causar doenças em humanos foram divididas em famílias cujo as principais são: Flaviviridae (vírus da Dengue - DENV, Zika - ZIKAV e VNO), Togaviridae (vírus da Chikungunya – CHKV), Reoviridae e Bunyaviridae (Veronesi, 1991; Rust, 2012; Lopes, 2014).

### 1.2 Flavivirus

A família Flaviviridae possui esse nome pois é derivada do latim *flavus*, que significa amarelo. Esta família é composta por três gêneros: Flavivirus, Pestivirus (do latim *pestis*, que significa “praga”) e Hepacivirus (do grego *hepatos*, que significa “fígado”) (Lindenbach et al., 2007).



**Figura 1.** Modelo de ciclo de transmissão dos Flavivirus, mais especificamente do ZIKAV (Petersen LR et al. N Engl J Med 2016;374:1552-1563).

O ciclo de transmissão dos Flavivirus é caracterizado por ciclos enzoóticos envolvendo hospedeiros vertebrados primários (geralmente primatas, aves, pequenos mamíferos ou roedores). Neste ciclo, o homem geralmente não desenvolve viremia suficiente para infectar novamente os mosquitos de forma eficiente e não contribui para o ciclo de transmissão, sendo o hospedeiro final neste ciclo. Para sua manutenção na natureza essas zoonoses dependem de espécies de animais, que não os humanos, com a exceção do DENV e do ZIKAV. Neste caso, quando em áreas suburbanas ou urbanas, é um ciclo homem-mosquito-homem vetorizado principalmente pelo mosquito do gênero *Aedes* (Figura 1) (Mackenzie et al., 2004; Petersen, 2009; Petersen et al., 2016).



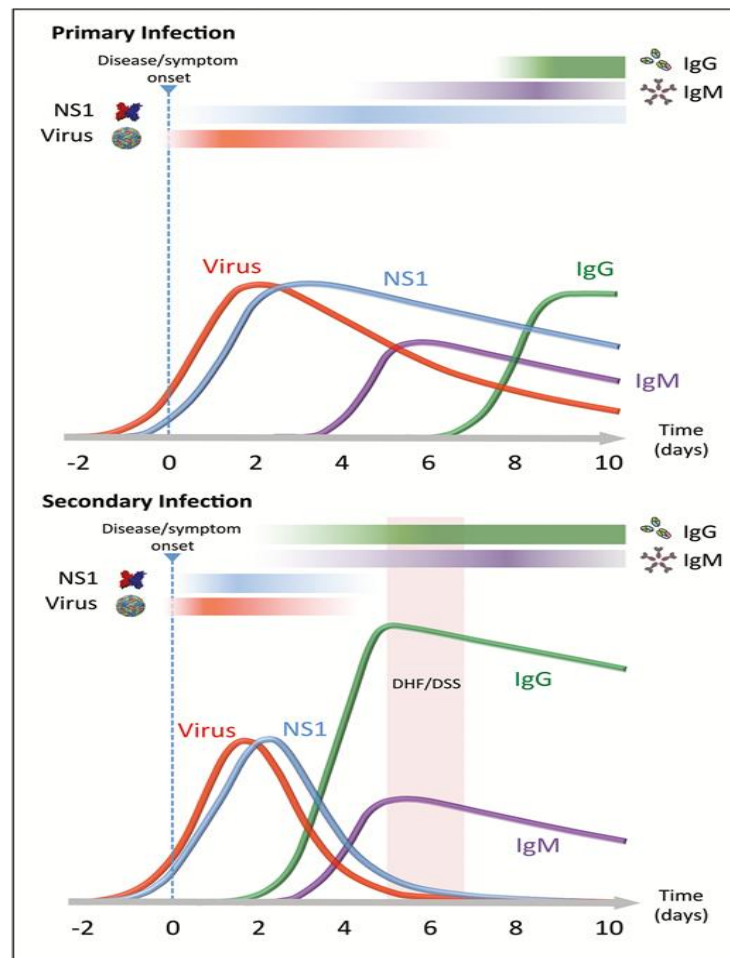
### 1.3 Dengue

A dengue é uma doença viral transmitida por mosquitos principalmente da espécie *Aedes aegypti* e *Aedes Albopictus* e que se espalhou rapidamente nos últimos anos (World Health Organization, 2018). Existem, no entanto, outros modos de transmissão como, nomeadamente, a transmissão vertical (da mãe para filho) (Basurko et al., 2018).

O DENV é dividido em 4 sorotipos distintos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4). Alguns sintomas da infecção por dengue são dor de cabeça, dor retro orbitária, erupção cutânea, náusea, vômito, diarreia, febre, mialgia e artralgia (Beckham et al., 2015). Quando ocorre de forma vetorial, após a picada de um mosquito infectado, acontece um período de incubação de 4 a 10 dias (World Health Organization, 2018). Os sintomas começam a aparecer de 3 a 5 dias após a exposição ao DENV (Castellanos e Coronel-Ruiz, 2014), e possui duração de geralmente 2 a 7 dias (World Health Organization, 2018). O dia em que se inicia o período febril é considerado o dia 1 da doença (Castellanos e Coronel-Ruiz, 2014).

Na infecção primária, a proteína não estrutural 1 (NS1) pode ser identificada desde o início da exposição ao DENV e pode ser detectada por até 4 dias após a fase virêmica (Castellanos e Coronel-Ruiz, 2014). Já a imunoglobulina M (IgM) aparece em torno do 3º dia (Muller, 2013) e pode permanecer detectável por até 3 meses (Castellanos e Coronel-Ruiz, 2014). A imunoglobulina G (IgG) geralmente não aparece durante a fase aguda da doença primária, mas na infecção secundária pode ser visto aproximadamente 3 dias após o início da doença (Muller et al., 2017) (Figura 2).

A reexposição a outro sorotipo aumenta o risco de sintomas mais graves relacionados à infecção, como a febre hemorrágica da dengue. A febre hemorrágica é caracterizada por aumento da permeabilidade vascular, trombocitopenia, hipotensão e manifestações hemorrágicas (Beckham et al., 2015).



**Figura 2.** Visualização do comportamento biológico da infecção por DENV.  
(Muller et al. J Infect Dis. 2017;215(suppl 2):S89-S95).

O diagnóstico é feito por sorologia como o ensaio imunoenzimático para captura de anticorpos IgM (Mac-ELISA) e IgG por ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay ou Ensaio de Imunoabsorção Enzimática). Tais métodos tipicamente não permitem a sorotipagem do vírus infectante, e são suscetíveis a reatividade cruzada com outros Flavivírus. Além disso, a sensibilidade geralmente é variável. A sorologia também pode detectar a NS1 por ELISA. Outras formas de diagnóstico compreendem os testes moleculares, como a RT-PCR, cujo o diagnóstico é mais específico. Assim como a detecção do antígeno NS1, a RT-PCR é considerada prova virológica de infecção (Hunsperger et al., 2016).

## 1.4 Zika Vírus

O ZIKAV foi identificado pela primeira vez em 1947, sendo isolado do sangue de um macaco Rhesus na floresta de Zika na Uganda (Dick et al., 1952). Em 1948 o ZIKAV foi isolado do *Stegomyia africanus* (*Aedes africanus*) dentro da mesma floresta (Dick et al., 1952). Em humanos, os primeiros relatos do ZIKAV são provenientes da Uganda e da República Unida da Tanzânia em 1952 (Smithburn, 1952). Posteriormente (1954), o ZIKAV também foi relatado em humanos na Nigéria (MacNamara, 1954; Hamel et al., 2015; Dhimal et al., 2015; Faye et al., 2014; Cao-Lormeau et al., 2016). Entre as décadas de 1960 a 1980, foram observados numerosos casos de infecções humanas principalmente em países da África e em países Asiáticos (Haddow et al., 2012; Borchardt, 2016; Olson et al., 1981).

As infecções por ZIKAV são na maioria das vezes assintomáticas (Mallet et al., 2014; Driggers et al., 2016). Muitas vezes os sintomas são leves (MacNamara, 1954) e similares a outras infecções por arbovírus incluindo febre, erupções cutâneas, conjuntivite, dores musculares e articulares, mal-estar, exantema maculopapular pruriginoso e cefaleia. Tais sintomas podem perdurar por 1 semana (Mallet et al., 2014; Driggers et al., 2016; World Health Organization, 2016).

Em 2007 ocorreu um grande surto ZIKAV na ilha Yap na Micronésia (primeiro fora da África e Ásia) (Lanciotti et al., 2008; Duffy et al., 2009). Entre 2012 e 2014 ocorreram surtos em outros quatro grupos de ilhas do Pacífico: Polinésia Francesa, Ilha de Páscoa, Ilhas Cook e Nova Caledônia (Roth et al., 2014). Nas Américas acredita-se que o local inicial do surto do ZIKAV ocorreu na região nordeste do Brasil, se espalhando rapidamente para o norte afetando outros países da América do Sul, América Central e chegando à América do Norte, mais especificamente no México (Fauci e Morens, 2016). Foram identificadas duas linhagens distintas do vírus: a africana e a asiática. A asiática é considerada a responsável pelos surtos nas Américas (Haddow et al, 2012).

A transmissão do ZIKAV ocorre principalmente pela picada do mosquito do gênero *Aedes* (particularmente o *Aedes aegypti*). Porém, também existem meios de transmissão não vetorial. Por exemplo, na Polinésia Francesa 2 recém-nascidos tiveram infecção pelo ZIKAV após 4 dias do nascimento. As infecções dos bebês podem ter sido adquiridas por transmissão transplacentária ou durante o parto (Besnard et al, 2014). Outro meio de transmissão de forma não vetorial é a transmissão sexual. Tal suspeita foi levantada após um homem infectado por ZIKAV transmitir o vírus para sua esposa (FoyComments et al, 2011). Por fim, outra forma não vetorial é a transmissão via transfusão sanguínea (Barjas-Castro et al, 2016).

Diversos estudos apontam o ZIKAV como responsável por vários desfechos que revelam possível associação do vírus com malformações congênitas e graves complicações neurológicas e autoimunes (Cao-Lormeau et al, 2014). Estas incluem a microcefalia e outros defeitos cerebrais congênitos (Rasmussen, 2016), síndrome de Guillain-Barré (Cao-Lormeau et al, 2016), trombocitopenia grave (Sharp et al, 2016) e anormalidades oculares graves (Yepez et al, 2017).

### **1.5 Segurança transfusional**

A hemoterapia no Brasil é regulamentada por Notas Técnicas, Regulamentos Federais, Regulamentos Sanitários e Regulamentos Técnicos Específicos, que envolvem todo o ciclo do sangue (coleta, processamento, estocagem, distribuição e aplicação do sangue, seus componentes e derivados) (Brasil, 2014).

A segurança do sangue é um fator primordial e este fato está explícito em diversas normas como por exemplo, o artigo 2 da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N° 34, de 11 de junho de 2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que dispõe sobre as boas práticas no ciclo do sangue. Esta resolução apresenta como objetivo:

“Estabelecer os requisitos de boas práticas a serem cumpridas pelos serviços de hemoterapia que desenvolvam atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue e componentes e serviços de saúde que realizem procedimentos transfusionais, a fim de que seja garantida a qualidade dos processos e produtos, a redução dos riscos sanitários e a segurança transfusional.”

Ainda, o artigo 5 inciso 8 e 32 do Decreto Nº 38.689, de 07 de dezembro de 2017, que estabelece o Estatuto da Fundação Hemocentro de Brasília (FHB) atribuindo como competência da FHB destacam a importância da segurança transfusional, versando respectivamente:

“Realizar exames especializados visando à segurança das transfusões em pacientes especiais, por intermédio do Laboratório de Imunohematologia de Pacientes”; e

“Garantir a realização dos procedimentos acima, dentro dos padrões de qualidade e normas sanitárias vigentes, implantando novas tecnologias que visem aumentar a qualidade e segurança para a obtenção, armazenamento, transporte e transfusão dos hemocomponentes e na atenção à saúde dos pacientes”.

O ciclo do sangue se inicia com a elaboração de estratégias para captação de doadores que se enquadrem nos critérios de seleção estabelecidos pelo Ministério da Saúde, em legislação vigente, visando assegurar a sua proteção e a dos receptores. Após o registro e a cada doação o candidato será informado sobre os desconfortos associados à doação, e posteriormente o candidato passa pela triagem clínica onde será avaliado o seu estado de saúde naquele momento. No caso de inaptidão, o candidato devera ser informado sobre o motivo da inaptidão e, quando necessário, é encaminhado ao serviço de referência. Para aqueles que estão aptos após a triagem clínica, o sangue é coletado por profissional devidamente treinado em quantidade suficiente para doação e realização dos testes laboratoriais. Após alguns minutos de observação e passadas as devidas informações e recomendações o doador é liberado. O sangue total obtido será processado visando a obtenção de hemocomponentes eritrocitários, plasmáticos e/ou plaquetários. Tais hemocomponentes são

devidamente armazenados até a liberação dos exames de qualificação do sangue do doador (Brasil, 2014).

Atualmente, há obrigatoriedade de realização de testes laboratoriais de alta sensibilidade no intuito de detectar agentes infecciosos. Esses testes basicamente são realizados através de métodos sorológicos e/ou por testes que buscam a presença de ácido nucleico viral. Os testes para detecção de agentes infecciosos que são obrigatórios são: Hepatite B, Hepatite C, HIV-1 e 2, Doença de Chagas, Sífilis e HTLV I/II. As metodologias utilizadas para a detecção da presença de cada um desses agentes infecciosos podem ser observadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Testes de detecção para agentes infecciosos:

<b>Agente</b>	<b>Testes para detecção</b>
Sífilis	Detecção de anticorpo anti-treponêmico ou não-treponêmico
Doença de Chagas	Detecção de anticorpo anti-T cruzi por método de ensaio imunoenzimático (EIE) ou quimioiluminescência (QLM).
Hepatite B	I - Detecção do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBV) - HBsAg; II - Detecção de anticorpos contra o capsídeo do HBV - anti-HBc (IgG ou IgG + IgM); e III - Detecção de ácido nucleico (NAT) do HBV.
Hepatite C	I - Detecção do anticorpo contra o vírus da hepatite C (HCV) ou detecção combinada de anticorpo + antígeno do HCV; e II - detecção de ácido nucleico (NAT) do HCV
AIDS	I - Detecção de anticorpo contra o HIV ou detecção combinada do anticorpo contra o HIV + antígeno p24 do HIV; e II - Detecção de ácido nucleico (NAT) do HIV.
HTLV I/II	Detecção de anticorpo contra o HTLV I/II

Fonte: Adaptado da Portaria Nº 158, de 4 de fevereiro de 2016, Ministério da Saúde.

Como observado acima, não existe a obrigatoriedade de detecção de arboviroses no sangue doado. Porém, existe a preocupação em relação a esses agentes, como pode ser observado na Nota Técnica Conjunta ANVISA/SAS/MS nº 011/2017, que diz respeito à Febre Amarela (YFV), e na

Nota Técnica Conjunta ANVISA/SAS/MS nº 002-2016 que diz respeito ao Zika e à Chikungunya.

Considerando a possibilidade da transmissão de YFV ocorrer por meio de transfusão sanguínea, a Nota Técnica Conjunta ANVISA/SAS/MS nº 011/2017 foi emitida baseada nos seguintes aspectos: i) existem registros de casos de febre amarela silvestre no Brasil; ii) existem relatos de transmissão viral por transfusão após a vacinação de doadores de sangue, apesar de ainda não existir comprovação de transmissão de YFV via transfusão de hemocomponentes oriundos de indivíduos que contraíram a doença através da picada de mosquitos; iii) parte dos indivíduos infectados pelo YFV são assintomáticos; iv) os casos relatados são da forma silvestre, existindo o risco de exposição de indivíduos não vacinados em áreas silvestres, rurais ou de mata e; v) e não existem informações sobre o tempo de inaptidão à doação após a recuperação do indivíduo infectado. A nota em questão indica como inapto: a) os candidatos a doação não vacinados que vivam em áreas silvestres, rurais ou de mata dos municípios com casos suspeitos e/ou confirmados; b) indivíduos que viajaram pra tais áreas e que não foram vacinados (inaptos por 30 dias); c) candidatos a doação com diagnóstico clínico e/ou laboratorial de febre amarela (inaptos por 6 meses) e; d) candidatos à doação vacinados recentemente (inaptos por 4 semanas a partir da data da vacinação).

Em relação à prevenção da transmissão dos vírus Zika e Chikungunya por transfusão de sangue, a Nota Técnica Conjunta ANVISA/SAS/MS nº 002-2016 considerou, principalmente, que: i) atualmente todos os estados possuem casos autóctones de ZIKAV; ii) apesar da principal forma de transmissão do ZIKAV ser via vetor, existem evidências de transmissão do ZIKAV por transfusão sanguínea e por via sexual; iii) ainda não existem evidências de transmissão do CHKV por transfusão de hemoderivados; iv) a possibilidade de transmissão desses vírus não pode ser descartada. Nesta nota, foram destacadas as seguintes ressalvas: a) candidatos a doação que tiveram contato sexual com alguém diagnosticado com ZIKAV nos últimos 90 dias deverão aguardar 30 dias após o último

contato sexual; b) infectados e diagnosticados com ZIKAV e/ou CHKV, deverão aguardar por um período de 30 dias após a recuperação clínica completa; c) candidatos a doação que foram para regiões endêmicas ou com epidemias confirmadas para CHKV, ou residem nessas áreas, deverão aguardar 30 dias.

Porém, todas as orientações apontadas por essas notas técnicas reservam-se a critérios de triagem clínica, não contemplando testes laboratoriais.

## **1.6 Arbovírus e transfusão de sangue**

A relação entre arbovírus, especialmente entre Flavivírus, e infecção por meio de transfusão de sangue foi descrita pela primeira vez durante a epidemia do vírus do Nilo Ocidental (VNO), que ocorreu em 2002 nos Estados Unidos. No ano em questão, foram identificados 23 pacientes que apresentaram sintomas característicos da infecção por VNO quatro semanas após a transfusão de glóbulos vermelhos leucorreduzidos e não leucorreduzidos, plaquetas ou plasma fresco congelado proveniente de 16 doadores com viremia (9 deles relataram sintomas virais antes ou após a doação, 5 eram assintomáticos e 2 não foram localizados para avaliação). Tal estudo demonstrou que hemácias transfundidas, plaquetas e plasma fresco congelado podem transmitir o VNO (Pealer et al., 2003).

A primeira evidência da possível transmissão do DENV por transfusão de sangue ocorreu em Hong Kong também em 2002. Uma mulher internada, de 76 anos, foi diagnosticada com anemia por deficiência de vitamina B12 e recebeu uma transfusão de sangue. Dois dias após a transfusão ela desenvolveu febre que diminuiu três dias depois. Além disso, a paciente apresentou anticorpos IgM reagentes para DENV. O doador foi um indivíduo assintomático de 17 anos que, baseado em resultados de testes moleculares, apresentou positividade para o vírus da DENV tipo 1 (Chuang et al., 2008). Outro caso de possível infecção por DENV associada à



transfusão de sangue ocorreu em Cingapura, um país no qual a doença é endêmica. Em 2007 um doador assintomático acusou febre um dia após a doação. A amostra de soro armazenada foi positiva para o vírus da DENV tipo 2, conforme verificado por meio de um ensaio de reação em cadeia da polimerase (PCR). O receptor das hemácias do doador apresentou febre e mialgia 2 dias após a transfusão. O receptor do plasma fresco do doador apresentou febre e piora do derrame pleural no dia seguinte à transfusão. Ambos os receptores foram positivos para o vírus da DENV tipo 2, com evidência sorológica de infecções por DENV (Tambyah et al., 2008).

Recentemente foi publicado um relato de caso relacionando a transfusão de plaquetas e a transmissão do ZIKAV. O doador relatou febre, mal-estar e dores de cabeça 3 dias após a doação, e ao analisar a amostra armazenada por RT-PCR (Reverse Transcriptase Chain Reaction ou Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa) foi observada a positividade para o ZIKAV. A RT-PCR do ZIKAV e as análises de isolamento do vírus em culturas de células do soro do receptor transfundido após um transplante de fígado também foram positivas. Dez sequências nucleotídicas parciais da estirpe ZIKAV que foram detectadas no doador foram comparadas com a do receptor, revelando uma homologia de 99,8% entre as duas estirpes (Barjas-Castro et al., 2016).

## 2. JUSTIFICATIVA

Como observado, diversas evidências apontam para a transmissão de arbovírus por transfusão sanguínea. As infecções por arboviroses apresentam sintomas suaves e até mesmo assintomáticas em indivíduos imunocompetentes, porém a transfusão de hemoderivados em pacientes em estado potencialmente crítico, e que muitas vezes estão imunocomprometidos, pode levar a sintomas mais graves (Faddy et al., 2016). Apesar da eficiência da transmissão de arboviroses por transfusão sanguínea ser ainda desconhecida (Faddy et al., 2016; Kashima et al., 2016), estes vírus podem desafiar o principal objetivo dos bancos de sangue, que é fornecer constantemente sangue seguro para toda a população. Muitas vezes a contaminação dos derivados de sangue com os patógenos, responsáveis por infecções assintomáticas em grande parte dos indivíduos saudáveis, dentre eles potenciais doadores de sangue, somente é detectada quando uma morbidade e/ou mortalidades significantes sejam observadas em receptores de transfusão sanguínea.

Não existem estudos que abordam esta temática no Distrito Federal. Portanto, torna-se importante a avaliação dos doadores da Fundação Hemocentro de Brasília no intuito de se observar a prevalência do ZIKAV e do DENV, especialmente em um período de alto número de casos reportados na população geral.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Investigar a presença dos arbovírus ZIKAV e DENV em doadores de sangue da Fundação Hemocentro de Brasília.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o período de maior número de casos prováveis de Dengue no Distrito Federal (e possivelmente outras arboviroses) entre os anos de 2015 a 2017 para determinar o período de seleção das amostras;

- Testar as amostras de soro de doadores de sangue da Fundação Hemocentro de Brasília para a presença de RNA viral de ZIKAV por RT-PCR;

- Testar as amostras de soro de doadores de sangue da Fundação Hemocentro de Brasília para a presença de anticorpos IgM anti-DENV e antígeno NS1 por ELISA;

- Verificar a eficiência da triagem realizada pela Fundação Hemocentro de Brasília;

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Estratégia Experimental

O presente estudo foi desenvolvido de acordo com a estratégia experimental demonstrado na figura 3.

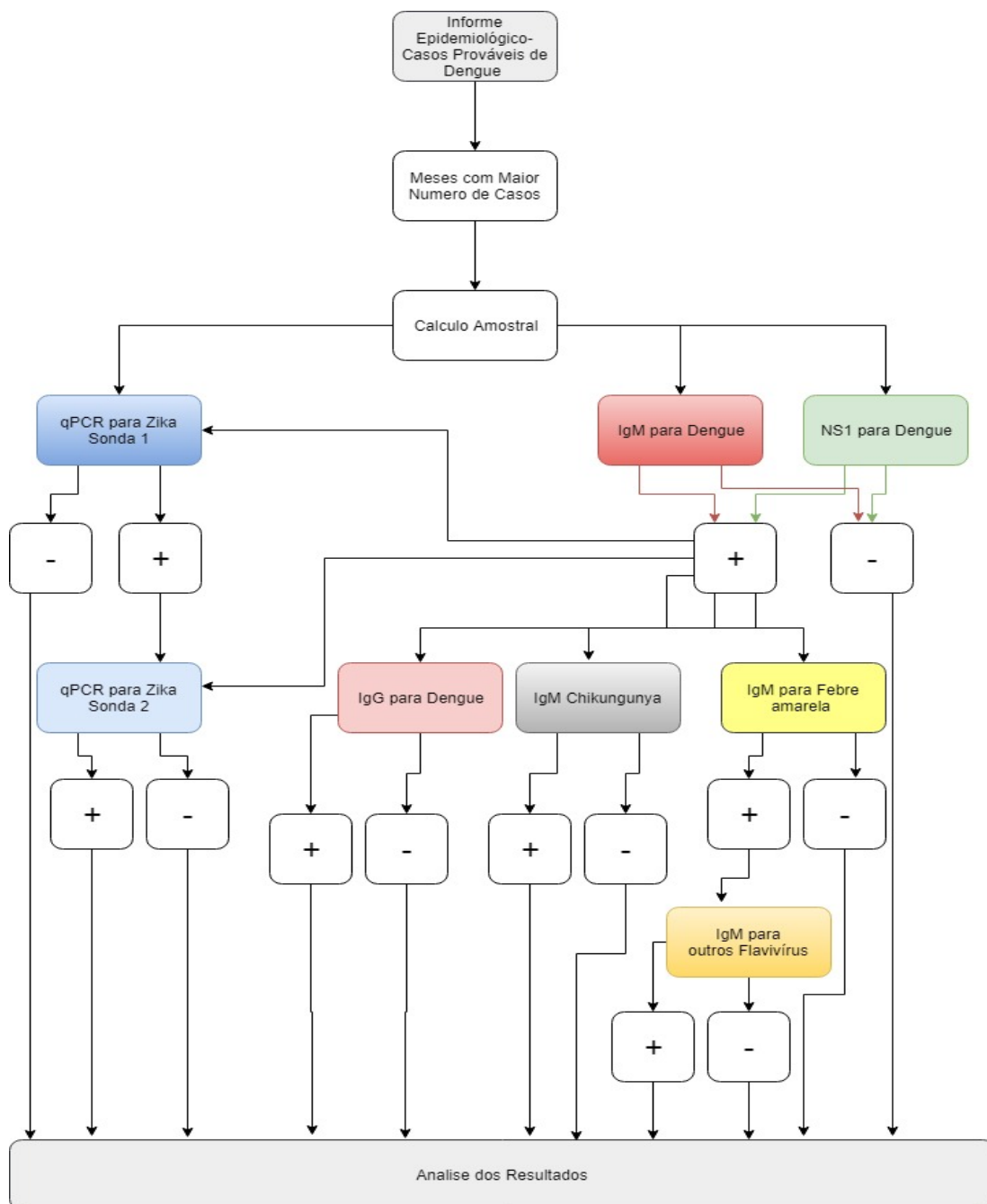
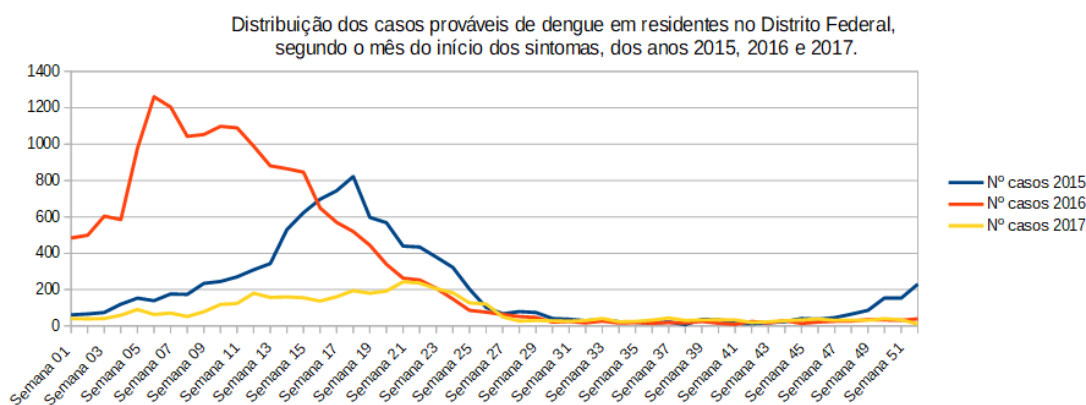


Figura 3. Estratégia experimental do estudo

## 4.2 Casuística

Para realização desse trabalho foram escolhidos 6 meses (Dezembro de 2015 a Maio de 2016) baseando-se nos números de casos prováveis de dengue nos anos de 2015 e 2016 (Gráfico 1). Os dados referentes à distribuição dos casos prováveis de dengue em residentes no Distrito Federal foram retirados do Informativo Epidemiológico de Dengue, Chikungunya e Zika realizado pela Secretaria de Estado de Saúde do DF, tendo este como fonte primária o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) de 2016 a 2018.



**Gráfico 1.** Distribuição dos casos prováveis de dengue em residentes no Distrito Federal, segundo o mês do início dos sintomas, dos anos 2015, 2016 e 2017. Dados retirados do Informativo Epidemiológico de Dengue, Chikungunya e Zika, realizado pela Secretaria de Estado de Saúde do DF. (Tabela disponível no anexo 1).

## 4.3 Cálculo amostral

Entre os dias 01/12/2015 e 31/05/2016 foram realizadas 28.238 doações, número este de amostras utilizadas para calcular o tamanho amostral ideal para o estudo. Para tal, foi utilizado um programa gratuito e com código aberto para estatísticas epidemiológicas disponível no site <http://www.openepi.com>.

Para este cálculo foi determinada uma margem de erro de 5% com intervalo de confiança de 95%. Assim, observamos que para que a

amostragem fosse representativa da população estudada seria necessário um número de amostras mínimo de 380 indivíduos.

#### **4.4 Obtenção das amostras**

Por mês, recebemos de forma aleatória aproximadamente 80 amostras de soro de doadores da Fundação Hemocentro de Brasília referentes aos meses Dezembro de 2015 a Maio de 2016. Tais amostras foram obtidas a partir da soroteca daquele hemocentro, no momento de seu descarte. Após o recebimento dessas amostras dados de gênero e idade e região administrativa/cidade e estado foram coletados. Ao final obtivemos 475 amostras, número superior ao valor mínimo obtido no cálculo amostral.

#### **4.5 ELISA para o antígeno NS1 e IgM de DENV**

Para a detecção qualitativa e semiquantitativa de NS1 de DENV e IgM anti-DENV, foi realizada a metodologia de ELISA. Para NS1 utilizou-se o kit Platelia™ Dengue NS1 Ag (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, Califórnia, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Para a análise de IgM anti-DENV foi utilizado o kit IgM capture ELISA da Panbio Diagnostics (Abott, Chicago, Illinois, EUA), também de acordo com as recomendações do fabricante. Após as reações, a leitura dos resultados foi realizada em um espectrofotômetro da *BioTek™ ELx800™ Absorbance Microplate Readers* (Fisher Scientific, ) nos comprimentos de 450 e 620nm, e as análises foram feitas com o auxílio do software Gen5™ Version 2.09 (Biotek, Winooski, Vermont, EUA).

#### **4.6 ELISA para IgG de Dengue e IgM de Chikungunya**

Nas amostras IgM anti-DENV ou NS1 positivas ou inconclusivas foram realizados testes de Elisa para IgG anti-DENV utilizando o kit Dengue IgG da EUROIMUNN (Lübeck, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante. Para detecção de IgM anti-CHIKV foi utilizado o kit

Chikungunya IgG da EUROIMMUN ((Lübeck, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante. Os resultados foram avaliados após leitura no espectrofotômetro da *BioTek™ ELx800™ Absorbance Microplate Readers* (Fisher Scientific, ), utilizando-se o software Gen5™ Version 2.09 (Biotek, Winooski, Vermont, EUA).

#### **4.7 Ensaio imunoenzimático para captura de anticorpos IgM (Mac-ELISA) para YFV**

Para as amostras que apresentaram resultado reagente para IgM de DENV ou NS1 foram realizados testes de Mac-ELISA para YFV. O teste foi realizado por metodologia *in house* no Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF). Foram utilizados reagentes fabricados pelo Instituto Carlos Chagas, e o método foi padronizado e validado antes do uso em laboratório, seguindo as normas do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), sendo esse realizado de forma sigilosa. O ponto de corte da absorbância para que o resultado fosse considerado negativo foi abaixo de 0,2.

Quando a amostra foi considerada reagente verificou-se a possibilidade de reações cruzadas, isto é, o indivíduo poderia ter sido exposto a outros flavivírus. Para tal, realizou-se MAC-ELISA para IgM de ZIKAV e DENV, e quando o resultado apresentou positividade para 1 e/ou 2 desses vírus, o resultado foi considerado “indeterminado” (reatividade para dois ou mais flavivírus).

#### **4.8 RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) para ZIKAV**

##### **4.8.1 Extração do RNA**

Após obtenção de 475 amostras de soro dos doadores, parte das amostras (300µl) foi separadas e submetidas à extração do RNA viral utilizando-se o kit *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN, São Paulo, Brasil) e o equipamento de extração automatizada *Maxwell®16 System* (QIAGEN, São Paulo, Brasil) seguindo as instruções do fabricante. Como controle

foram obtidas amostras controles (cultura celular) cedidas pela Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, que passaram pelo mesmo método de extração.

#### **4.8.2 Transcrição Reversa**

Em seguida, o RNA viral foi submetido à reação de transcrição reversa utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Foi realizado também em cada lote de transcrição um controle negativo, ou seja, uma reação sem amostra.

#### **4.8.3 qRT-PCR**

O DNA complementar (cDNA) resultante da transcrição reversa foi utilizado para a reação de detecção viral por qRT-PCR (tecnologia Taqman™) utilizando o Applied Biosystems *QuantStudio™ 3 & 5 Real-Time PCR System* com o software *QuantStudio™ 3 and 5 Firmware v1.3.3*. (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O método utilizado foi desenvolvido e padronizado *in house* pela Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Universidade de São Paulo - USP. O método consiste em uma primeira reação de volume total de 25µl, dos quais: 4 µl de água mili-Q, 12,5µl de Taqman™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1,5µl de cada *primer* (835F e 911cR) a 5mM e 0,5µl de sonda (ZIKAV860FAM) a 5mM. A reação foi submetida às seguintes condições de temperatura: 60°C por 30 segundos, 50°C por 10 minutos, 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, e por fim, 60°C por 30 segundos. O *threshold cycle* foi de 0,05 e as amostras com o CT (*threshold cycle*) maior que 36 foram consideradas sem amplificação e foram submetidas a nova análise utilizando outra sonda (ZIKAV1107FAM) e iniciadores (1086F e 1162cR) com as mesmas concentrações de cada reagente. Ainda, para aquelas amostras que apresentaram positividade para IgM anti-DENV e NS1 de DENV, esta segunda reação também foi realizada. A sequência dos

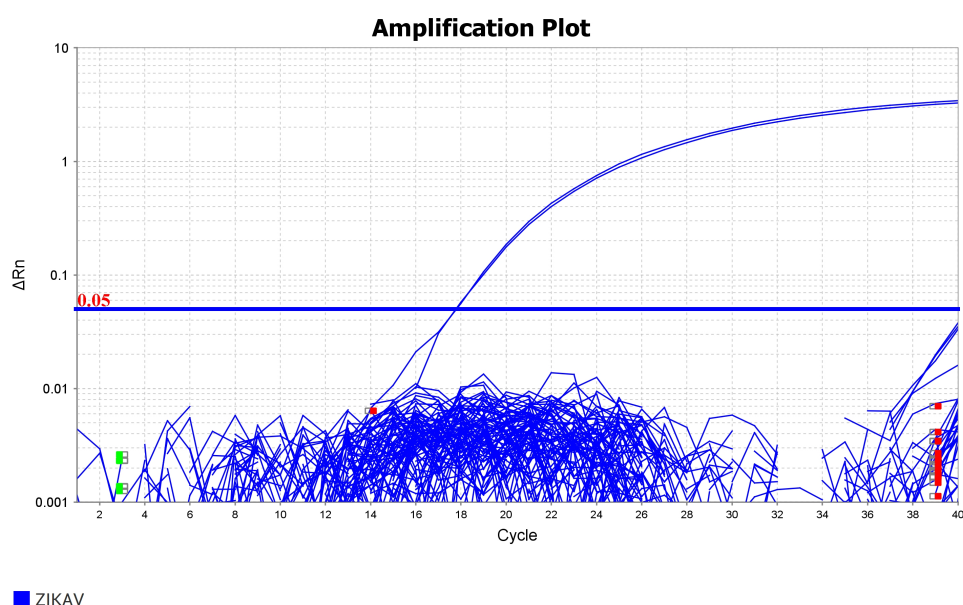


iniciadores e sondas utilizados foi descrito Lanciotti et al (2008) e estão descritos na tabela 2. Todas as placas continham controle negativo e positivo, em duplicata.

**Tabela 2.** Descrição dos conjuntos de iniciadores e sonda.

Referência	Alvo	Nome do(a) Primer/Sonda	Sequência 5'-3'	Posição
Lanciotti et al., (2008)	prM	ZIKAV 835	TTGGTCATGATACTGCTGATTGC	835–857
		ZIKAV 911c	CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC	911–890
		ZIKAV 860-FAM	CGGCATACAGCATCAGGTGCATAGGAG-MGB	860–886
Lanciotti et al., (2008)	E	ZIKAV 1086	CCGCTGCCCAACACAAG	1086–1102
		ZIKAV 1162c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	1162–1139
		ZIKAV 1107-FAM	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA	1107–1137

A figura 4 representa os resultados de um experimento independente de detecção de ZIKAV por qRT-PCR.



**Figura 4.** Imagem do software QuantStudio™ 3 and 5 Firmware v1.3.3 proveniente de uma reação do presente estudo. Nela podemos observar o número do ciclo, o CT, e o platô.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Caracterização das Amostras

Inicialmente as amostras utilizadas, selecionadas ao acaso, foram avaliadas quanto ao gênero e média de idade. Foi observado um maior número de doadores do sexo masculino em nosso estudo. Essas informações são mostradas na tabela 3:

**Tabela 3.** Caracterização da população objeto de estudo:

<b>Gênero</b>	<b>Número de indivíduos</b>	<b>Média de Idade <math>\pm</math>DP</b>
Masculino	315	36,48 $\pm$ 10,77
Feminino	160	32,36 $\pm$ 10,21
<b>TOTAL</b>	<b>475</b>	<b>35,08 <math>\pm</math> 10,75</b>

### 5.2 ELISA para o antígeno NS1 de DENV

Após análise do antígeno NS1 de DENV por ELISA (prova virológica de infecção), não foi observada positividade para este antígeno para nenhuma das 475 amostras testadas.

### 5.3 ELISA para o IgM de DENV

No intuito de avaliar o contato recente com o DENV ou possível presença do vírus, as 475 amostras foram avaliadas quanto a presença do anticorpo de fase aguda IgM. Trinta e três (33) amostras apresentaram resultado reagente para o referido anticorpo, o que corresponde à 6,95% dos doadores.

#### **5.4 ELISA para o antígeno IgG de DENV**

No intuito de se observar possível reação cruzada com anticorpos anti-DENV de fase crônica (exposição prévia) ou até mesmo a presença concomitante de IgM e IgG para DENV, a maioria das amostras positivas para os anticorpos IgM de DENV foram testadas para anticorpos IgG de DENV. De 29 amostras positivas para IgM de DENV, 19 (65,52%) também foram positivas para IgG de DENV. Quatro amostras positivas para IgM de DENV não foram testadas para IgG.

#### **5.5 MAC-ELISA para o antígeno IgM de YFV, DENV e ZIKAV**

Para observar a possível presença de reação cruzada com anticorpos IgM de outras arboviroses do gênero Flavivírus, foi realizado um MAC-ELISA (protocolo do CDC) para IgM de YFV nas amostras que se apresentaram reagentes para IgM de DENV (em duplicata). O ponto de corte da absorbância para que o resultado fosse considerado negativo foi abaixo de 0,2. De 32 amostras testadas, 7 (21,87%) foram reagentes para IgM de Febre Amarela. De acordo com o protocolo do CDC, as amostras que se apresentarem positivas para Febre Amarela devem ser testadas por MAC-ELISA para IgM de DENV e IgM de ZIKAV. Assim, das 7 amostras testadas, todas apresentaram resultado reagente para DENV. Por fim, 2 dessas amostras apresentaram resultado positivo para IgM de ZIKAV. O resultados dessas amostras podem ser observadas na Tabela 4. Destaca-se que de 7 amostras que apresentaram resultado reagente para mais de um flavivírus, 5 apresentaram os títulos de anticorpos maiores para DENV.

**Tabela 4.** Resultados das amostras consideradas inconclusivas obtidos por MAC–ELISA para YFV, ZIKAV e DENV

Número da Amostra	MAC-Elisa Febre Amarela	MAC-Elisa Dengue	MAC-Elisa Zika
1445	0,385	<b>0,739</b>	0,143
	0,377	<b>0,764</b>	0,155
1475	<b>0,335</b>	0,269	0,180
	<b>0,325</b>	0,246	0,133
1612	0,202	<b>0,354</b>	0,135
	0,202	<b>0,343</b>	0,123
1629	0,309	<b>0,503</b>	0,133
	0,285	<b>0,504</b>	0,114
1631	0,618	<b>1,478</b>	0,227
	0,627	<b>1,443</b>	0,210
1643	<b>0,252</b>	0,245	0,151
	<b>0,255</b>	0,232	0,175
1672	0,445	<b>0,949</b>	0,447
	0,428	<b>0,977</b>	0,453

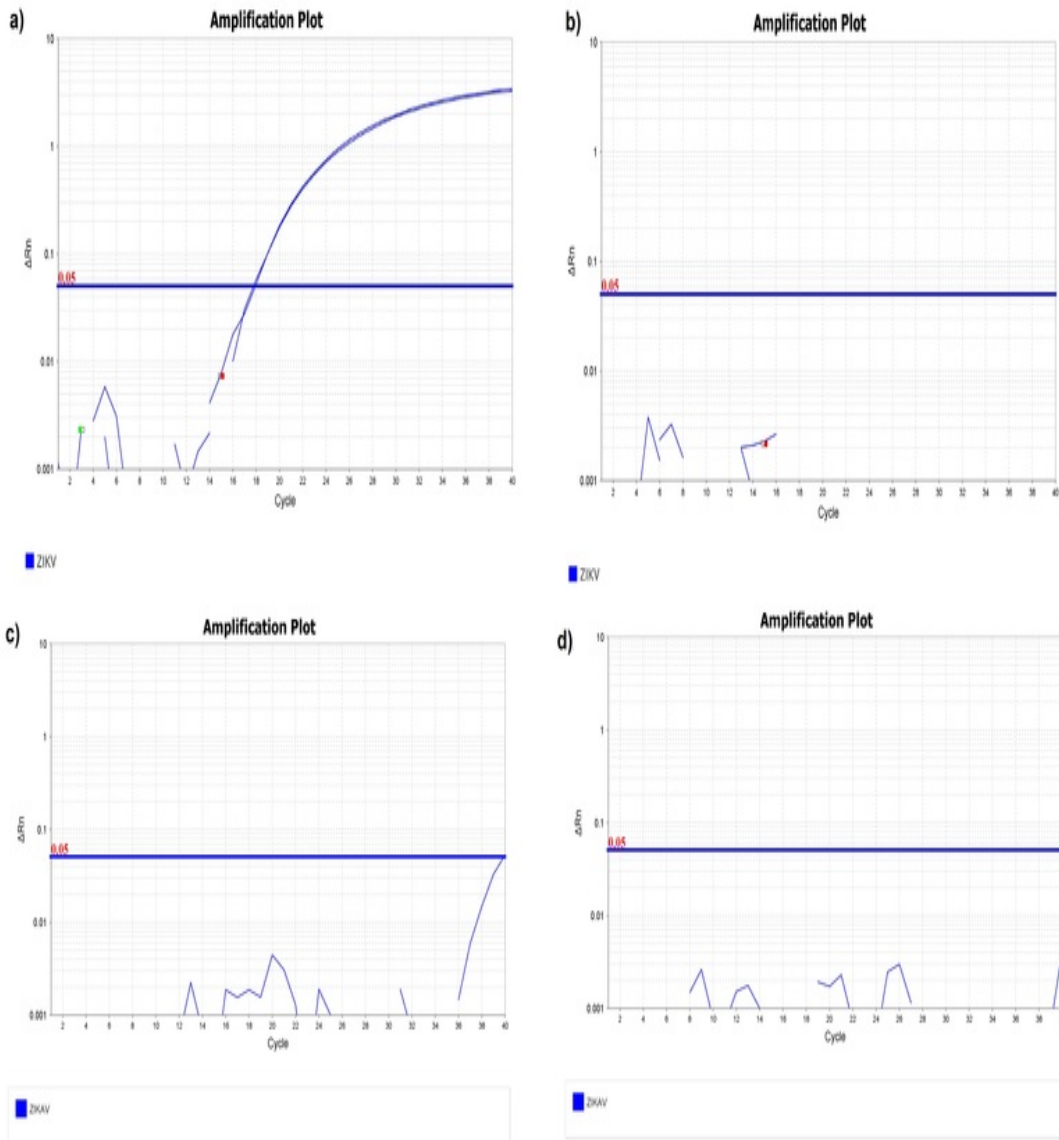
## 5.6 ELISA para o antígeno IgM de CHKV4

Para observar a possível presença de reação cruzada com anticorpos IgM de outra arbovirose de gênero distinto, amostras positivas para os anticorpos IgM de DENV foram testadas para anticorpos IgM de CHKV. Nenhuma das 33 amostras positivas para IgM de DENV apresentou resultado reagente para IgM de CHKV.

## 5.7 RT-qPCR para ZIKAV

Todas as 475 amostras selecionadas para nosso estudo foram testadas para a presença do material genético do ZIKAV por RT-qPCR. Inicialmente, foi utilizado um primeiro par de iniciadores com a sonda localizada na posição 860 do genoma do ZIKAV. A maioria das amostras apresentou resultados negativos para a presença do ZIKAV, porém algumas delas (29 amostras) apresentaram amplificação em ciclos mais tardios (CT acima de 36) (Figura 5). Para essas amostras um segundo par de iniciadores com a sonda localizada na posição 1107 foi utilizado. Não foi observada amplificação para essas amostras. Para as amostras que

apresentaram positividade para IgM de DENV (ver item 5.3) foram realizados novos testes de RT-qPCR para ZIKAV com os dois pares de *primers* e sondas para confirmação. Todas as amostras apresentaram resultados negativos para ZIKAV.



**Figura 5** – Possíveis resultados obtidos na RT-qPCR onde: a) Controle Positivo em Duplicata; b) Controle Negativo em Duplicata; c) Amostra Considerada Duvidosa; e d) Amostra Considerada Negativa.

## 6. DISCUSSÃO

A existência de arboviroses transmitidas muitas vezes pelo mesmo vetor, a epidemiologia e sintomatologia semelhantes (muitas vezes suaves ou assintomáticas), a dificuldade de distinguir clinicamente (Wilder-Smith et al., 2017; Faddy et al., 2016) e a existência de diversas evidências que apontam para a transmissão de arboviroses por transfusão sanguínea (Faddy et al., 2016) nos mostram a importância da utilização de testes sorológicos e moleculares capazes de diagnosticar e diferenciar essas arboviroses.

O DENV possui 7 proteínas não estruturais (NS), incluindo a NS1 que é secretada pelas células infectadas e é encontrada no soro em níveis detectáveis. Níveis elevados de NS1 no soro indicam diretamente o aumento da carga viral e estabelecem ainda a correlação positiva entre a viremia e os perfis de NS1 (Libraty et al., 2002). Em nosso estudo, na análise do antígeno NS1 de DENV por ELISA (prova virológica de infecção), não foi observada positividade para este antígeno em nenhuma das amostras testadas. Esse resultado vem de encontro com outros trabalhos que avaliaram esse mesmo antígeno em doadores de sangue em áreas de risco e/ou surto como Austrália 0% (Rooks et al., 2016) e na Índia 0% (Mangwana, 2015). Já quando comparamos com a Arábia Saudita o valor difere, pois foi observada positividade para este antígeno em 5,3% dos doadores deste país (Ashshi et al., 2017) indicando um possível maior número de doadores assintomáticos no local (Anexo 2).

A ausência ou baixa porcentagem do antígeno NS1 em doadores de sangue não excluem a possibilidade de transmissão via transfusão sanguínea. Estudos mostram que em amostras conhecidamente positivas para o RNA do DENV, menos de 1/5 apresentam resultados reagentes para o antígeno NS1, demonstrando a baixa sensibilidade da detecção desse antígeno (Matos et al., 2016; Stramer et al., 2013) e a importância da busca

de métodos mais sensíveis. A detecção do antígeno NS1 do DENV é considerada mais específica quando comparada a detecção do anticorpo IgM do DENV, sendo então considerada mais confiável para confirmação do diagnóstico (Hunsperger et al., 2016; Wilder-Smith et al., 2017), demonstrando a presença da partícula viral e apresentando menor reação cruzada com antígenos de outras arboviroses. Por outro lado, a eficácia do teste de detecção do RNA viral é superior ao ELISA para IgM de DENV (Matos et al., 2016).

Nosso trabalho mostrou que aproximadamente 6,95% dos doadores apresentavam o anticorpo de fase aguda IgM para DENV. O valor é superior aos obtidos no México (2% em 2007) (Rodríguez et al., 2010) e Brasil (0% em 2012) (Ribas-Silva et al., 2012), mas quando comparamos o nosso estudo a trabalhos mais atuais como na Malásia cujo o resultado foi de 4,2% (Harif, N. F. Et al, 2014) e na Arábia Saudita que foi de 5,5% (Ashshi et al., 2017), podemos observar o aumento do número de amostras positivas à medida que a doença se espalha para novas áreas, além de diversos surtos conforme relatado pela WHO (World Health Organization, 2018) (Anexo 2).

Apesar das amostras apresentarem resultado reagente para IgM de DENV, nenhuma delas apresentou positividade para o NS1, o que levanta a hipótese de que não havia a presença do vírus nas amostras testadas. Visto que o anticorpo IgM surge em torno do terceiro dia após o início dos sintomas (Castellanos e Coronel-Ruiz, 2014), constata-se que pode ter havido contato recente com o DENV, principalmente em um período em que foram relatados um alto número de casos suspeitos de Dengue. Por outro lado, a positividade para este marcador nem sempre indica a presença da partícula viral, uma vez que o período de viremia pode ter acabado (Wichmann et al., 2006). Ainda, estudos mostram que a persistência de IgM contra o DENV ocorre, variando de 2 a 6 meses sem a existência da partícula viral (Nogueira et al., 1992; Castellanos e Coronel-Ruiz, 2014). Em contrapartida, a ausência de IgM também não indica a ausência do vírus, caso o teste tenha sido realizado até o sétimo dia da infecção, momento em que ainda não ocorreu a produção de IgM (Cheah et al., 2014).

A presença de IgM por longo período (2 a 6 meses), conforme apontam alguns estudos (Nogueira et al., 1992; Castellanos e Coronel-Ruiz, 2014) também não pode ser descartada. Parte das amostras que apresentaram resultado positivo para IgM de DENV (19 amostras) também possuíam a presença do anticorpo IgG para DENV, e sendo assim, o contato pode não ter sido tão recente. Ainda, a possibilidade de que uma segunda infecção do DENV tenha ocorrido também deve ser considerada. A coexistência de IgG e IgM para DENV também indica esse tipo de infecção (Lima et al., 2012).

Quando levada em consideração a possibilidade de reação cruzada, nosso estudo demonstrou que algumas amostras que apresentaram resultado reagente para IgM de DENV também apresentaram resultado reagente IgM para outros flavivírus testados (YFV e ZIKAV). Mais especificamente, das 33 amostras positivas para IgM de DENV, 7 apresentaram resultado reagente para IgM de YFV e, destas, 2 apresentaram positividade para o anticorpo IgM de ZIKAV (ambos testes realizados por MAC-ELISA). Nenhuma das amostras podem ser considerada positivo para um vírus específico, visto que em nenhuma o título de anticorpos neutralizantes foi quatro vezes maior que o observado em outro flavivírus testado (Biscayart et al., 2014). Estes resultados são confirmados por estudos que mostram que testes sorológicos (IgM) para flavivírus podem gerar resultados falso-positivos devido à forte reatividade cruzada entre eles (Hancock et al. 2014; Priyamvada et al. 2016). Esse fato causa dificuldade no diagnóstico, especialmente em regiões onde existam mais de um tipo de flavivírus endêmicos (Hui Y, et al 2018). Adicionalmente, também pode ocorrer co-infecção, visto que o principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti*, é comum para diferentes tipos de flavivírus (Xavier et al., 2018). Outra dificuldade que existe para a confirmação do contato recente com os flavivírus é a vacinação como, por exemplo, para a YFV e futuramente o DENV (Wilder-Smith et al., 2017). Por outro lado, o mesmo não ocorre quando diferentes gêneros de arboviroses são considerados. Este trabalho demonstrou que nenhuma das 33 amostras positivas para IgM



de DENV apresentou resultado reagente para IgM de CHKV. Esse resultado pode indicar que os métodos diagnósticos de detecção de anticorpos IgM utilizados podem ser capazes de distinguir infecções entre alfavírus (chikungunya) e os flavivírus (dengue, zika, febre amarela, vírus do Nilo Ocidental e encefalite japonesa).

Posto a dificuldade da identificação do tipo de flavivírus quando se utiliza a detecção de anticorpos, causado principalmente pela possibilidade da presença de reações cruzadas, estudos se utilizam de técnicas capazes de detectar o RNA viral de forma mais específica (Landry e George, 2017). Isso mostra a importância da utilização de técnicas moleculares para detecção de arboviroses. Utilizando-se dessa abordagem (detecção por RT-qPCR), nosso estudo não detectou o RNA do ZIKAV em nenhuma das 475 amostras selecionadas. Além disso, para fins de comprovação, aquelas amostras que apresentaram reação cruzada entre DENV e ZIKAV foram retestadas por RT-qPCR e mantiveram o resultado negativo para o ZIKAV.

Os principais métodos utilizados para detecção de ZIKAV são os sorológicos (ELISA) e os moleculares (RT-qPCR), sendo este último o teste padrão ouro (Faye O, et al. 2008; NUNES, Magda Lahorgue et al. 2016). No Brasil, atualmente, o diagnóstico é feito por laboratórios de referência através do isolamento do vírus em culturas de células e detecção molecular por sistemas *in house* de RT-PCR em laboratórios de referência (S. Kashima, et al. 2016). Porém, a realização de testes moleculares ainda não garante o sucesso da detecção do ZIKAV em amostras de todos os pacientes infectados. Em um estudo de avaliação da qualidade dos testes de diagnóstico molecular do ZIKAV no Brasil, dos quinze laboratórios, somente quatro relataram resultados corretos para todas as amostras. Seis deles apresentaram resultados falso positivos e cinco relataram entre 1 e 2 resultados falso-negativos. Este último pode ser causado devido à baixas concentrações de ZIKAV nas amostras testadas (Fischer et al., 2018). Justificativa para tal é apontada por estudos que mostram que a sensibilidade de detecção de RT-qPCR é limitada quando utilizadas amostras com baixas concentrações virais (Hui et al., 2018; Balm et al.,

2012; George *et al.*, 2017). Essa possibilidade deve ser considerada em nosso estudo.

Existem ainda outras possibilidades para o resultado em questão, como o fato de a RT- qPCR detectar em amostras de sangue o vírus no início dos sintomas, que ocorre por volta dos quatro a sete dias após a infecção (Xavier *et al.*, 2018). Ademais, fatores como a presença de inibidores da PCR no soro do paciente também levam à falha na quantificação e podem diminuir a eficiência de amplificação da RT-qPCR (Rutsaert *et al.*, 2018).

Como observado em alguns estudos, a prevalência do ZIKAV em doadores assintomáticos realmente não é alta. Em Vitória da Conquista (Bahia-Brasil), 676 amostras foram analisadas para ZIKAV, CHIKV e DENV- I, II , III, IV utilizando RT-PCR. Na análise em questão nenhuma amostra apresentou resultado positivo (Sharma *et al.*, 2018). Nos Estados Unidos foram analisadas 358.786 amostras de doadores, dentre as quais 23 foram inicialmente reativas ao ZIKAV e, destas, 14 apresentaram positividade em testes adicionais (Galel *et al.*, 2017). Em Martinica (Caribe), das 4.129 doações de sangue testadas, 76 foram consideradas positivas (Gallian *et al.*, 2017). No Estado de São Paulo, Brasil, de 1393 amostras de doadores analisadas, o RNA do ZIKAV foi detectado em 37 amostras (Slavov *et al.*, 2017). Já na Polinésia Francesa, 42 dos 1.505 doadores de sangue foram considerados positivos para o ZIKAV por PCR (Musso *et al.*, 2014) (Anexo 3).

Tendo em vista o dever de fornecer sangue e hemoderivados seguros para a população do Brasil, medidas devem ser adotadas para garantir essa segurança além das notas técnicas em relação aos arbovírus restringindo-se a critérios de triagem clínica, não contemplando testes laboratoriais. A segurança do sangue no Brasil pode ser melhorada adotando-se métodos como os utilizados atualmente pelo FDA (Food and Drug Administration), onde testa-se um conjunto de doações (*pool*) por métodos moleculares, o que pode tornar a análise mais econômica e menos onerosa (FDA, 2018). Por outro lado, o custo de testes moleculares ainda é alto, e a utilização de

testes sorológicos poderiam ser aplicados (IgM e/ou NS1). Todavia, existe a dificuldade apresentada atualmente em relação à sensibilidade dos kits de ELISA. A alternativa seria a utilização do MAC-ELISA, por ser um teste sorológico mais sensível (Sathish et al., 2002). Porém, o tempo de procedimento para a liberação dos resultados (3 dias) ainda inviabiliza sua implementação nas rotinas de um banco de sangue. Além destes fatores (custo, sensibilidade e tempo do procedimento), a adoção de uma metodologia de diagnóstico de arboviroses em bancos de sangue deve também levar em consideração, do ponto de vista custo-benefício para implementação, a localização geográfica (regiões endêmicas), público receptor e período de captação do sangue (períodos em que ocorre aumento do número de casos).

## 7. CONCLUSÃO

Conforme demonstrado, as amostras testadas no período de maior surto de DENV (e possivelmente outras arboviroses), não apresentaram RNA de ZIKAV durante o período testado. Devido ao grande impacto da infecção pelo ZIKAV, principalmente em mulheres gestantes, sugere-se a realização de testes, principalmente quando esse for o público receptor.

Em relação à DENV, a maioria das amostras que foram reagentes para IgM foram também reagentes para IgG, o que pode indicar a presença do IgM na ausência do vírus. Além disso, não foi observada positividade para o antígeno NS1 no teste de DENV por ELISA. É necessário ressaltar a importância do RT-PCR para DENV para um diagnóstico confiável.

Ademais, este trabalho demonstrou que nenhuma das amostras positivas para IgM de DENV apresentou resultado reagente para IgM de CHKV, mostrando que os métodos diagnósticos de detecção de anticorpos IgM utilizados conseguem diferenciar infecções entre os alfavírus e os flavivírus.

## 8. ANEXOS

### Anexo 1.

**Tabela 4.** Distribuição dos casos prováveis de dengue em residentes no Distrito Federal, por semana epidemiológica, segundo o mês do início dos sintomas, dos anos 2015, 2016 e 2017. Dados retirados do Informativo Epidemiológico de Dengue, Chikungunya e Zika, realizado pela Secretaria de Estado de Saúde do DF, cuja fonte primária é o Sinan.

Mês de início de sintomas	Semana epidemiológica de sintomas	Nº casos 2015	Nº casos 2016	Nº casos 2017
Janeiro	Semana 01	61	484	41
	Semana 02	66	499	39
	Semana 03	74	604	41
	Semana 04	120	585	59
	Semana 05	153	977	91
Fevereiro	Semana 06	139	1261	63
	Semana 07	176	1204	71
	Semana 08	174	1043	52
	Semana 09	234	1053	78
Março	Semana 10	245	1098	118
	Semana 11	270	1090	124
	Semana 12	309	989	180
	Semana 13	343	881	157
Abril	Semana 14	530	865	160
	Semana 15	623	846	155
	Semana 16	697	649	137
	Semana 17	744	570	161
	Semana 18	822	519	194
Maio	Semana 19	597	444	180
	Semana 20	568	339	192
	Semana 21	439	263	243
	Semana 22	434	253	236
Junho	Semana 23	379	207	205
	Semana 24	322	148	182
	Semana 25	203	86	127
	Semana 26	102	76	121
Julho	Semana 27	67	63	50
	Semana 28	79	52	27
	Semana 29	74	47	30
	Semana 30	41	21	28
	Semana 31	37	25	26
Agosto	Semana 32	29	17	30
	Semana 33	35	27	41
	Semana 34	23	16	23
	Semana 35	21	19	25
	Semana 36	16	15	32
Setembro	Semana 37	22	19	44
	Semana 38	8	17	30
	Semana 39	36	25	33
	Semana 40	34	15	34
Outubro	Semana 41	15	9	33
	Semana 42	13	25	19
	Semana 43	18	17	23
	Semana 44	24	29	29
Novembro	Semana 45	41	14	33
	Semana 46	37	22	38
	Semana 47	46	26	31
	Semana 48	65	27	31
Dezembro	Semana 49	86	35	31
	Semana 50	154	33	40
	Semana 51	153	31	34
	Semana 52	230	39	11
Total		10228	17718	4213

## Anexo 2

**Tabela 5.** Comparação da prevalência de DENV por diferentes testes.

Estudo	País	Número de indivíduos	DENV-NS1	Anti-IgM DENV	Anti-IgG DENV	Testes Moleculares
<i>Rodríguez et al., 2007</i>	México	800	---	2%	---	---
<i>Busch et al., 2008</i>	Honduras	2994	---	---	---	0,3%
<i>Busch et al., 2008</i>	Brasil	4858	---	---	---	0,04%
<i>Busch et al., 2008</i>	Austrália	5879	---	---	---	0%
<i>Stramer et al., 2012</i>	Porto Rico	15.350	---	---	---	0,19%
<i>Ribas-Silva et al., 2012</i>	Brasil	213	---	0%	2%	---
<i>Dias et al., 2012</i>	Brasil	500	---	---	---	0,4%
<i>Harif, N. F. Et al., 2014</i>	Malásia	360	---	4,2%	2,8%	---
<i>Ashshi, 2015</i>	Arábia Saudita	100	1%	6%	7%	---
<i>Mangwana, 2015</i>	Índia	1709	0%	---	---	---
<i>Rooks et al., 2016</i>	Austrália	6182	---	---	---	0%
<i>Rooks et al., 2016</i>	Austrália	973	0%	---	---	---
<i>Ashshi et al., 2017</i>	Arábia Saudita	910	5,3 %	5,5 %	38,9%	---
<i>Sharma et al., 2018</i>	Brasil	676	---	---	---	0%
Presente Estudo	Brasil	475	0%	6,9%	---	---

### Anexo 3.

**Tabela 6.** Comparação da prevalência de ZIKAV.

<b>Estudo</b>	<b>País</b>	<b>Número de indivíduos</b>	<b>Taxa (%)</b>
<i>Musso et al., 2014</i>	<i>Polinésia Francesa</i>	1.505	2,8%
Slavov Et al., 2017	Brasil	1.393	2,6%
Gallian et al., 2017	Caribe	4.129	1,8%
Galel et al., 2017	Estados Unidos	358.786	0,003%
Sharma et al., 2018	Brasil	676	0%
Presente Estudo	Brasil	475	0%

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHSHI, A.M. “Serodetection of Dengue Virus and Its Antibodies among Blood Donors in the Western Region of Saudi Arabia: A Preliminary Study.” *Blood Transfusion* 13.1 135–138. 2015.

BECKHAM, J. et al. Tyler. “Arbovirus Infections.” *Continuum (Minneapolis, Minn.)* 21.6 NEUROINFECTIOUS DISEASE; 1599–1611. 2015.

BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill.*;19(13):pii=20751. 2014.

BIGGERSTAFF, B.J.; PETERSEN, L.R: Estimated risk of West Nile virus transmission through blood transfusion during an epidemic in Queens, New York City. *Transfusion*; 42:1019–1026. 2002.

BISCAYAT, C. et al. Yellow fever vaccine- associated adverse events following extensive immunization in Argentina. *Vaccine*. 32(11):1266–1272. 2014.

BORCHARD, R.A. Zika virus: a rapidly emerging infectious disease. *JAAPA*; 29: 48–50. 2016.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N° 34, de 11 de junho de 2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dispõe sobre as boas práticas no ciclo do sangue. 02 de junho de 2014.

BRASIL. Decreto N° 38.689, de 07 de dezembro de 2017. Aprova a alteração do Estatuto da Fundação Hemocentro de Brasília. Diário Oficial, Brasília, DF, 07 dez. 2017.



BRIAN, D. et al. Probable Non–Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. Volume 17, Number 5. May 2011.

CAO-LORMEAU, V.M. et al. Guillain-Barre syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case–control study. *Lancet*; 387: 1531–1539. 2016.

CAO-LORMEAU, V. M. et al. Emerging arboviruses in the Pacific. *The Lancet* ,Volume 384, No. 9954, p1571–1572, 1 November 2014

CASTELLANOS, J. E.; CORONEL-RUIZ, C.. Dengue disease diagnosis: A puzzle to be solved.*rev.fac.med.*, Bogotá , v. 62,n. 4,p. 617-629, Oct. 2014 .

CHEAVILIER, M.S. et al. Use of blood donor screening data to estimate Zika virus incidence, Puerto Rico, April–August 2016. *Emerg Infect Dis.* May. 2017.

CHEAH, W.K. et al. “A review of dengue research in malaysia.” *The Medical journal of Malaysia* 69 Suppl A : 59-67.2014.

DICK, G. W; KITCHEN, S.F, HADDOW, A.J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 46: 509–520. 1952.

DICK, G.W. et al. Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties.*Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Volume 46, Issue 5, 1, Pages 521–534. September 1952.

DHIMAL, M. et al. Zika virus: yet another emerging threat to Nepal. *J Nepal Health Res Counc*; 13: 248–251. 2015.

DRIGGERS, R.W. et al. Zika virus infection with prolonged maternal viremia and fetal brain abnormalities. *N Engl J Med*; 374: 2142–2151. 2016.

DUFFY, M.R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.*;360:2536–43. 2009.

FDA, Food and Drug Administration. Revised Recommendations for Reducing the Risk of Zika Virus Transmission by Blood and Blood Components. July 6, 2018. Disponível em:<https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/UCM518213.pdf>. Acessado em Julho de 2018.

FAUCI, A.S; MORENS, D.M. Zika virus in the Americas – yet another arbovirus threat. *N Engl J Med*; 374: 601–604. 2016.

FAYE, O. et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century. *PLoS Negl Trop Dis*; 8: e2636. 2014.

FAYE, O. Et al. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. *J Clin Virol*. 43(1): 96-101. Sep. 2008.

FISCHER, C. et al. External Quality Assessment for Zika Virus Molecular Diagnostic Testing, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 24.2018.

FOURCADE, C. et al. Viral load kinetics of Zika virus in plasma, urine and saliva in a couple returning from Martinique, French West Indies. *J Clin Virol*; 82:1-4. 2016.

GALEL, S.A. et al. First Zika-positive donations in the continental United States. *Transfusion*. 57:762-9. 2017.

GALLIAN, P. C. et al. Zika virus in asymptomatic blood donors in Martinique. *Blood*. 29:263-6. 2017.

GEORGE, K., et al. Zika virus testing considerations: lessons learned from the first 80 real-time reverse transcription-PCR-positive cases diagnosed in New York State. *J. Clin. Microbiol.* 55, 535–544 . 2017.

GUBLER, D.J. Epidemic dengue/denguehemorrhagic fever as a public health, social, and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* 10: 100-103. 2002.

HADDOW, A. D. et al. Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. *PLoS Negl Trop Dis* 6(2): e1477. 2012.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika virus infection in human skin cells. *J Virol*; 89: 8880–8896. 2015.

HAPUARACHICHI, H.C. et al. Epidemic resurgence of dengue fever in Singapore in 2013-2014: A virological and entomological perspective. *BMC Infectious Diseases.* 16:300. 2016.

HARIF, N,F., et al. Seropositive status of dengue virus infection among blood donors in North Malaysia. *Asian J Transfus Sci.*;8:64. 2014.

HAYES, E.B. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis*; 15: 1347–1350. 2009.

HUI, Y. et al. Micro-droplet Digital Polymerase Chain Reaction and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Technologies Provide Highly Sensitive and Accurate Detection of Zika Virus. Volume 33, Issue 3, pp 270–277. Jun. 2018.

HUNSPERGER, E.A. et al. The Performance of Dengue Diagnostic Tests in a Single-Specimen Diagnostic Algorithm. J Infect Dis. 2016.

JAIN, J. et al. Evaluation of an immunochromatography rapid diagnosis kit for detection of chikungunya virus antigen in India, a dengue-endemic country. Virol J. 11;15(1):84. May, 2018.

KASHIMA, S. N; SLAVOV, D.T. Zika virus and its implication in transfusion safety. Rev Bras Hematol Hemoter, 38, pp. 90-91. 2016.

LANCIOTTI, R.S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Emerg Infect Dis; 14:1232–9. 2008.

LANCIOTTI, R.S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic. Yap State, Micronesia, 2007. Emerg Infect Dis.14:1232–9. 2008.

LANDRY, M.L, GEORGE, K. Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection. Archives of Pathology & Laboratory Medicine:, Vol. 141, No. 1, pp. 60-67. January 2017.

LIMA, J. R. C. et al . Interpretation of the presence of IgM and IgG antibodies in a rapid test for dengue: analysis of dengue antibody prevalence in Fortaleza City in the 20th year of the epidemic. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba , v. 45, n. 2, p. 163-167, Apr. 2012

LINDENBACH, B,D; THIEL, H; RICE C.M.*Flaviviridae: the viruses and their replication*. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. 5 th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 1101-52. 2007.

LOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect*; 44: 302–307. 2014.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C.. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua* , v. 5,n. 3,p. 55-64, set. 2014 .

MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat. Med.*, v. 10, n. 12, p. s98-s109, 2004.

MACNAMARA, F.N. Zika virus : A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. Volume 48, Issue 2, Pages 139-145. March 1954.

MALLET, H.P, et al. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis.*;20:1085–6. 2014.

MALLET, H.P, et al. Dengue virus type 3, South Pacific Islands, 2013. *Emerg Infect Dis.* 20:1034–6. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Critérios técnicos para triagem clínica de doadores de sangue em face do vírus da Zika e Chikungunya. Nota Técnica Conjunta MS-Anvisa nº 002-2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Critérios técnicos para triagem clínica de doadores de sangue em face do vírus da febre amarela. Nota Técnica Conjunta MS-Anvisa nº 011-2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Emergência epidemiológica de febre amarela no Brasil, no período de dezembro de 2016 a julho de 2017. In: v. 48 n. 28. 2017.

MORSE, S. S. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging infectious diseases*, v. 1, n. 1, p. 7–15, 1995.

MULLER, D.A; YOUNG, P.R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res* 98: 192–208. 2013.

MUSSO, D. et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill.* 19. 2014.

NUNES, M. L. et al . Microcefalia e vírus Zika: um olhar clínico e epidemiológico do surto em vigênciano Brasil,. *J. Pediatr. (Rio J.)*, Porto Alegre, v. 92, n. 3, p. 230-240, June 2016.

PETERSEN, L.R; BUSCH, M.P. Transfusion-transmitted arboviruses. *Vox Sang*; 98:495-503. 2010.

OLSON, J. G; KSIAZEK, S. T. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Volume 75, Issue 3, 1, Pages 389–393. January 1981.

RASMUSSEN, S. A. et al. Zika virus and birth defects—reviewing the evidence for causality. *N Engl J Med.* 374:1981–7.2016.

RIBAS-SILVA, Rejane Cristina; EID, Andressa Ahmad. Dengue antibodies in blood donors. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, São Paulo , v. 34, n. 3, p. 193-195, 2012 .

RODRIGUEZ, M.G., et al. “Serologic Surveillance for West Nile Virus and Other Flaviviruses in Febrile Patients, Encephalitic Patients, and Asymptoma-

tic Blood Donors in Northern Mexico.” *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 10.2 151–157. 2010.

ROTH, A. et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections – an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Euro Surveill.*;19. 2014.

RUST, R.S. Human arboviral encephalitis. *Semin Pediatr Neurol.*;19(3):130-51. Sep. 2012.

SAHU, R. et al. Neurologic complications in dengue virus infection: a prospective cohort study. *Neurology*; 83(18):1601–1609.2014 .

SECRETARIA DE SAÚDE – DF. Subsecretaria de Vigilância à Saúde. Informativo Epidemiológico de Dengue, Chikungunya e Zika. Semana epidemiológica nº 01 a 52 de 2015 e 2016. Nº 01, janeiro de 2017.

SECRETARIA DE SAÚDE – DF. Subsecretaria de Vigilância à Saúde. Informativo Epidemiológico de Dengue, Chikungunya e Zika. Semana epidemiológica nº 01 a 52 de 2017. Nº 01, janeiro de 2018.

SHARMA, R, et al. Surveillance of donated blood during the 2016 arbovirus outbreak in Brazil. *J Med Virol.* 2018.

SHARP, T. M. et al. Zika virus infection associated with severe thrombocytopenia. *Clin Infect Dis.* 63:1198–201. 2016.

SHU, P.Y. et al. Dengue virus serotyping based on envelope and membrane and nonstructural protein NS1 serotype-specific capture immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol*; 42:2489–94. 2004.

SLAVOV, S.N. et al. Zika virus RNA detection in asymptomatic blood donors during an outbreak in the northeast region of São Paulo state, Brazil, 2016. *Transfusion*. 57(12):2897–901. 2017.

SMITHBURN, K.C. Neutralizing antibodies against certain recently isolated viruses in the sera of human beings residing in East Africa. *J Immunol.*;69(2):223-34. Aug. 1952.

SATHISH, N et al. Comparison of IgM capture ELISA with a commercial rapid immunochromatographic card test & IgM microwell ELISA for the detection of antibodies to dengue viruses. *Indian J Med Res*, 115: 31-36. 2002.

VERONESI, R. Doenças infecciosas e parasitárias. 8 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan,. 1082 p. 1991.

WICHMANN, O. et al. Clinical features and pitfalls in the laboratory diagnosis of dengue in travelers. *BMC Infect Dis.*;6:20. 2006.

WHO, World Health Organization. Zika virus [Atualizado em 6 de Fevereiro de 2016]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/>. Acessado em Junho de 2018.

WHO, World Health Organization. dengue case classification. Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control, New edn. Geneva: WHO; 2009

WHO, World Health Organization. Dengue and severe dengue [Atualizado em 2 de Fevereiro de 2018] Disponível em:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/>. Acessado em Junho de 2018.



XAVIER, A. R. et al . Clinical and laboratory diagnosis of Zika fever: an update. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, Rio de Janeiro, v. 53, n. 4, p. 252-257, Aug. 2017.

YEPEZ, J.B. et al. Ophthalmic Manifestations of Congenital Zika Syndrome in Colombia and Venezuela. *JAMA Ophthalmology*. 135(5):440-447. 2017.