



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA  
CURSO DE FARMÁCIA**

**ANA CAROLINA ALVES MELO DE MOURA**

**PREVALÊNCIA DO ANTÍGENO NS1 DA DENGUE EM DOADORES DE SANGUE  
DE BRASÍLIA**

**BRASÍLIA, 2018**

ANA CAROLINA ALVES MELO DE MOURA

**PREVALÊNCIA DO ANTÍGENO NS1 DA DENGUE EM DOADORES DE SANGUE  
DE BRASÍLIA**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília.

**Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Haddad**

BRASÍLIA, 2018

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

MMS29 p Moura, Ana Carolina Alves Melo da  
Prevalência do antígeno NS1 da dengue em doadores de  
sangue de Brasília / Ana Carolina Alves Melo de Moura;  
orientador Rodrigo Haddad. -- Brasília, 2018.  
42 p.

Monografia (Graduação - Bacharel em Farmácia) --  
Universidade de Brasília, 2018.

1. Prevalência. 2. NS1. 3. Dengue. 4. Transfusão  
sanguínea. 5. Doadores de sangue. I. Haddad, Rodrigo ,  
orient. II. Título.

ANA CAROLINA ALVES MELO DE MOURA

**PREVALÊNCIA DO ANTÍGENO NS1 DA DENGUE EM DOADORES DE SANGUE  
DE BRASÍLIA**

**BANCA EXAMINADORA**



---

Orientador(a): Prof. Dr. Rodrigo Haddad  
(Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia – UnB/FCE)



---

Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferreira  
(Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia – UnB/FCE)



---

Prof(a). Dr. Daiani Cristina Cilião Alves Haddad  
(UNIEURO - Centro Universitário Euroamericano)

BRASÍLIA, 2018

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por me permitir viver esse sonho, pretendo servir a Ele com a minha formação. Lembro-me de orar com 18 anos, pedindo que as portas no meu caminho se abrissem, mas que fosse segundo a sua vontade, e assim foi feito em minha vida durante esses 5 anos de muita dedicação e bênçãos.

Agradeço a minha família, minha mãe (Juliana), minha avó (Wilma) e meu tio (Daniel), por todo o apoio e paciência. Vocês foram minha base durante esses anos, e a cada demonstração de carinho, como diminuir o volume da televisão porque eu estava estudando, só me deu mais força e representou o amor e zelo de vocês por mim.

Dedico esse parágrafo, a minha mãe que me proporcionou esse sonho e esteve sempre presente para ser meu apoio emocional e financeiro, e por sempre acreditar que eu fosse capaz de tudo que aconteceu. Muito obrigada por cada sacrifício e carinho incondicional.

Ao meu orientador, Rodrigo Haddad, por toda a paciência e aprendizado, e por ser um excelente mestre. Muito obrigada por cada oportunidade de realizar uma pesquisa e este trabalho ao seu lado.

Aos meus amigos, aqueles que a universidade me presenteou e aqueles que a vida me deu, agradeço por terem me ajudado a manter minha saúde mental e por acreditarem junto comigo nesse sonho. Muito obrigada pelo apoio e carinho em minhas crises de choro e ansiedade, e por compartilharem comigo as alegrias dessa caminhada.

## RESUMO

O vírus da dengue (DENV) é uma arbovirose do gênero *Flavivirus*, possui como características de seu gênero: ser esférico, com nucleocapsídeo e uma única fita de RNA viral. O DENV é subdividido em 4 subtipos, DENV 1/4, todos são comumente encontrados no Brasil. Por ser uma arbovirose sua transmissão natural é através de um vetor, *Aedes aegypti*. Porém, atualmente tem se discutido na literatura casos prováveis e possíveis de transmissão do vírus por meio de transfusão sanguínea. Com este risco, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença do antígeno viral NS1 da Dengue em 546 amostras de soro obtidas no banco de retrovigilância de doadores de sangue da Fundação Hemocentro de Brasília. Para isso, foi realizado ensaio imunoenzimático direto, para a captura do antígeno e expressão de resultados quantitativos e semiquantitativos. Não foram encontradas amostras com presença do antígeno, mas por se tratar de um método de triagem, é recomendada a realização de estudos com metodologias confirmatórias, como a pesquisa do RNA viral.

**Palavras-chaves:** Dengue, NS1, prevalência, doadores de sangue.

## ABSTRACT

The dengue virus (DENV) is an arbovirus of the genus *Flavivirus*. The virus is spherical with a nucleocapsid and possess a single viral RNA. The DENV is subdivided into 4 subtypes, DENV 1/4; all commonly found in Brazil. The natural transmission of this virus is through a vector, the *Aedes aegypti*. However, currently there have been probable and possible cases of transmission of the virus through blood transfusion reports in the literature. So, the objective of this study was to evaluate the presence of Dengue NS1 viral antigen in 546 serum samples obtained from the blood donor retrovigilance bank of the Hemocentro Foundation in Brasília. For this, a direct immunoenzymatic assay was performed to capture the antigen and to express quantitative and semiquantitative results. No sample with antigen presence was found. Because it is a screening method to carry others studies with a confirmatory methodology are recommended, such as viral RNA detection.

**Keywords:** Dengue, NS1, prevalence, blood donors.

## LISTA DE SIGLAS

Ag – Antígeno

C – Proteína do nucleocapsídeo

DENV – Vírus da dengue

E – Proteína do envelope

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

EUA – Estados Unidos da América

HTLV – Vírus linfotrópico da célula T humana

INC – Incorporação

M – Proteína de membrana

NS – Proteína não-estrutural

°C – Graus Celsius

ORF – *Open read frame* - quadro aberto de leitura

PCR – Reação em cadeia polimerase

prM – proteína pré-membrana

RNA – Ácido ribonucleico

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

## LISTA DE TABELAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabela 1.</b> Cálculo de característica da amostragem..... | <b>17</b> |
|---|-----------|

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Determinação do período de estudo. O número de casos prováveis de dengue foi baseado no Informativo Epidemiológico de Dengue, Chikungunya e Zika da Secretaria do Estado de Saúde do Distrito Federal, durante os anos de 2015 a 2017.....15

**Figura 2.** Estratégia experimental. Após identificação do período com maior número de casos notificados de dengue, foi realizado o cálculo amostral, a coleta das amostras, a detecção e determinação da prevalência do antígeno NS1.....16

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUÇÃO.....</b>                   | <b>1</b>  |
| <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>        | <b>3</b>  |
| <b>JUSTIFICATIVA.....</b>                | <b>7</b>  |
| <b>OBJETIVOS.....</b>                    | <b>8</b>  |
| <b>Objetivo Geral.....</b>               | <b>8</b>  |
| <b>Objetivos específicos.....</b>        | <b>8</b>  |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>ARTIGO .....</b>                      | <b>11</b> |
| <b>Introdução.....</b>                   | <b>12</b> |
| <b>Objetivo.....</b>                     | <b>13</b> |
| <b>Materiais e Métodos.....</b>          | <b>13</b> |
| <b>Resultados.....</b>                   | <b>15</b> |
| <b>Discussão.....</b>                    | <b>17</b> |
| <b>Conclusões.....</b>                   | <b>19</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>20</b> |
| <b>ANEXO I .....</b>                     | <b>23</b> |
| <b>NORMAS DO PERIÓDICO.....</b>          | <b>23</b> |
| <b>ANEXO II.....</b>                     | <b>28</b> |
| <b>Aprovação do comitê de ética.....</b> | <b>28</b> |

## INTRODUÇÃO

O vírus da dengue (DENV) é uma arbovirose do gênero *Flavivirus* a qual possui um relacionamento antigo com os seres humanos, tornando-se mais conhecida ao final da Segunda Guerra Mundial. Ela se alastrou pela maioria dos territórios mundiais por meio de seu vetor, o *Aedes aegypti*. Este vetor, que devido ao êxodo rural nas cidades, se multiplicou levando ao aumento dos casos de Dengue. As pessoas ao superpovoarem os centros das cidades, sem nenhum tipo de saneamento básico, auxiliaram na expansão do mosquito (VALLE et al, 2015). Sabemos que este cenário de precariedade das habitações populacionais até hoje é um problema, principalmente em áreas periféricas dos países, e continua a influenciar na propagação do vetor.

O DENV possui como característica de seu gênero uma cadeia simples de RNA como genoma, além de ser organizado em uma única ORF (*open read frame* - quadro aberto de leitura) (YOHAN et al, 2018). Possui dois conjuntos de genes: o primeiro com três genes responsáveis por produzir proteínas estruturais e o segundo com sete genes responsáveis em codificar proteínas não estruturais (NS). Nas proteínas não estruturais, está a NS1, foco deste estudo, primordial para a replicação do DENV e que pode ser encontrada na superfície e interior de células do paciente, assim como circulante no soro do infectado (SOLANKE et al, 2015).

Os testes utilizados para a pesquisa e triagem de NS1 devem proporcionar resultados rápidos e confiáveis da virose, o que auxiliará na manutenção da vigilância epidemiológica e diagnóstico do paciente (PORTO, 2014). Este antígeno pode ser encontrado circulando no paciente, no período de até 12 dias contados após a infecção pelo vírus (VALLE et al, 2015). O teste ELISA é um dos principais testes utilizados para a pesquisa da proteína NS1 do vírus da Dengue em amostras de soro, consiste em um teste acessível, conveniente, e com rapidez na obtenção dos resultados (ZHANG et al, 2014).

Durante uma transfusão de sangue, espera-se que o procedimento proporcione segurança, ou seja, não se encontre nenhum tipo de antígeno potencialmente perigoso no hemocomponente fornecido. Atualmente é comprovada a possibilidade de transmissão do DENV por meio da transfusão, porém faltam

informações quanto à efetividade da infecção no receptor (MATOS et al, 2016). Contudo, por muitas vezes os indivíduos (e potenciais doadores) infectados não apresentam sintomas, dificultando o diagnóstico e a prevenção da transmissão pela transfusão, assim a possibilidade de transmissão, mesmo mínima, dessa arbovirose é importante para certos grupos de receptores (LEVI, 2018).

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Atualmente, o DENV se apresenta de forma epidêmica por várias regiões do Brasil. Os primeiros casos foram relatados no início do século XX quando houve a proliferação pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Essa disseminação pelo território brasileiro se deu possivelmente pelo clima tropical, as movimentações de êxodo rural sem a devida estruturação de suporte à população e principalmente pela falta de saneamento (RAMOS e MACHADO, 2014).

Os primeiros sintomas dessa virose infecciosa, mas não contagiosa, inicia-se após três dias do contato com o vírus e perdura pelas próximas duas semanas. As manifestações clínicas mais comuns são: dores de cabeça, mal-estar, febre entre 39 a 40°C, petéquias, dor retro orbital, vermelhidão na parte superior do corpo, mialgia e artralgia. Essa virose apresenta ampla apresentação clínica, e os portadores do vírus podem ser assintomáticos, sintomáticos comuns, graves e letais (SAITO et al, 2017). Logo, se o paciente for assintomático dificultará o diagnóstico, pois na ausência de sinais e sintomas ele não procurará o médico para a realização dos exames complementares para a confirmação da patologia e pode permitir a disseminação da doença, seja por vetor ou transfusão.

A Dengue é uma arbovirose, que é replicada e transmitida por um vetor, o *Aedes aegypti*, que também é responsável pela transmissão de outros agentes virais, como Chikungunya e Zika; estas também têm causado epidemias no país (MANIERO et al, 2016). O DENV, pertence ao gênero *Flavivirus*, e é subdividido de acordo com particularidades antigênicas em DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4, e ambos são encontrados no território brasileiro. A Dengue é considerada hoje em dia um problema sério de saúde pública, já que existe a subnotificação dos casos o que dificulta a implementação de políticas públicas (COSTA, 2017).

O vírus possui características comuns ao seu gênero como: ser esférico, com nucleocapsídeo e uma única fita de RNA viral. Com esse genoma de cadeia simples, é codificado por ele sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) e três estruturais (C, prM / M e E) em uma única fase aberta de leitura (ORF - *open read frame*). A principal proteína para o diagnóstico do DENV é uma proteína não estrutural, denominada NS1, responsável pelas atividades de

replicação do *Flavivirus* e alvo da resposta imune do paciente (YOHAN et al, 2018). Ela pode estar associada a membranas e ser secretada, assim sua presença é confirmatória da virose, por comprovar a presença do DENV (VALLE et al, 2015).

A proteína NS1 é encontrada no sangue periférico do paciente com a virose até 12º dia após o contágio e início dos sintomas, tendo seu pico de sensibilidade no quarto dia após o início dos sintomas, ou seja, possui uma estreita janela de detecção (VALLE et al, 2015). Os testes mais recorrentemente utilizados para detecção dessa proteína são de dois tipos, imunoenzimáticos, como ELISA, e os imunocromatográficos. Ambos conseguem testar mais amostras em menos tempo se comparados a outros testes. Eles conseguem obter resultados correspondentes aos considerados testes padrão ouro, como a detecção de anticorpos, reação em cadeia da polimerase (PCR) e os métodos de identificação do agente etiológico (ZHANG et al, 2014).

Com o crescente aumento de números de casos confirmados de dengue, o meio científico viu a necessidade em se ter um diagnóstico precoce e eficiente, para assim, auxiliar em um início precoce de tratamento. A detecção da NS1 seja em soro ou plasma, é importante para o diagnóstico, principalmente em casos de infecções recentes. Assim, os testes de ELISA têm sido utilizados, e são considerados promissores para a triagem rápida da infecção pelo vírus da Dengue (ZHANG et al, 2014).

Dentre os kits de detecção para a proteína NS1 do DENV, o Platelia™ Dengue NS1 Ag, ensaio imunoenzimático sorológico (ELISA), apresenta seus resultados na forma qualitativa e semiquantitativa. Em estudos comparativos, observou-se que este é um teste de alta sensibilidade e com especificidade questionável, pois os resultados positivos são realmente positivos, mas nem todos os negativos são de fato negativos. Entretanto, este teste é considerado um bom meio de triagem para diagnóstico de DENV, em órgãos públicos e privados. Este método demonstrou grande sensibilidade para DENV 1, mas uma pequena queda nos outros três subgrupos (DENV 2/4), que pode ser explicado por vários fatores (PORTO, 2014).

Há diversos fatores que podem influenciar na exatidão do ELISA, tais como: os diferentes subgrupos, que possuem taxas diferentes de secreção da NS1; a

coleta precoce da amostra; e nos casos de infecção primária ou secundária. Em relação a este último, na infecção secundária ocorre o efeito de imunoamplificação, que pouco altera as concentrações de NS1, mas que pode vir a diminuir significativamente sua exatidão devido à formação de imunocomplexos cruzados com o antígeno. Como o teste se baseia na captura de antígeno, ficaria este prejudicado já que neste caso ele estará preso ao imunocomplexo (da COSTA; MARQUES-SILVA e MORELI, 2014).

Segundo a Agência de Vigilância Sanitária (2015), transmissão de patologias virais por meio da transfusão sanguínea é considerada muito rara, sendo poucas em milhares de hemocomponentes fornecidos. Contudo, mesmo que a transmissão via transfusão seja pequena, sua incidência não deve ser negligenciada. Na legislação atinente à transfusão sanguínea, não existe a obrigatoriedade em realizar os testes para DENV, como ocorre com o grupo de doenças infecciosas avaliadas como possíveis transmissoras por transfusão (SIDA - síndrome da imunodeficiência adquirida, a hepatite B e C, o HTLV- Vírus linfotrópico da célula T humana I / II, a doença de Chagas e a sífilis) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

As taxas de transmissão de DENV por transfusão sanguínea permanecem baixas por todo o mundo. No entanto, um estudo desenvolvido em Porto Rico apontou que a análise de triagem baseada na captura do antígeno NS1 não possui sensibilidade ideal, já que em alguns pacientes que apresentaram sorologia negativa, apresentaram positividade para o RNA viral, confirmando a presença do vírus. Neste estudo foi demonstrado que somente 20% dos pacientes que apresentaram positividade para o RNA do DENV apresentaram positividade para a NS1. Ainda, foram identificados quatro doadores positivos ao RNA de DENV que forneceram hemocomponentes a três receptores. Dentre esses receptores, um desenvolveu Dengue grave e os outros dois apresentaram febre após a transfusão sanguínea (MATOS et al, 2016).

Em uma pesquisa realizada por OH e colaboradores (2015) em Cingapura, com o aumento dos casos de Dengue no país, foi registrado um caso de transmissão do vírus por meio transfusional. Ainda que raro, o sangue de um doador que estava com a virose foi transfundido em 03 (três) pacientes diferentes, o que demonstra a fragilidade da segurança nos bancos de sangue. Além disso, houve o

relato de outros tipos de transmissão, como ferimentos por agulha e por transplante de órgãos (OH et al, 2015).

Em outro estudo desenvolvido no Brasil, no estado do Rio de Janeiro e Recife no ano de 2012, em um período de epidemia de dengue, foram identificadas entre 1 a 2% das bolsas de sangue doadas sendo positivas para o RNA-DENV, sendo estes doadores possivelmente assintomáticos. Houve a confirmação de 06 (seis) casos prováveis de dengue transmitidos por transfusão sanguínea, porém os receptores não desenvolveram sintomas da infecção (SABINO et al, 2015).

Dessa forma, se faz necessária a inclusão das arboviroses na lista de doenças triadas em bancos de sangue como possíveis patologias transmitidas por transfusão sanguínea em todo o mundo, principalmente em regiões endêmicas. O maior desafio seria encontrar técnicas com alta sensibilidade, especificidade e baixo custo, preservando assim a segurança na utilização dos hemocomponentes fornecidos por estes bancos.

## **JUSTIFICATIVA**

Quando surgem questionamentos quanto à qualidade do sangue fornecido pelos bancos de sangue, espera-se que estas bolsas estejam livres da presença de patógenos, como o vírus da dengue. Porém, a detecção do vírus da dengue não faz parte das doenças infecciosas avaliadas nos testes laboratoriais realizados nos hemocentros, antes da liberação da bolsa de sangue ou hemocomponentes. A presente pesquisa relata que o patógeno em estudo, por ser silencioso em seu início e muitas vezes não detectado, poderia ser transmitido durante a transfusão sanguínea. Então, a busca da proteína NS1 do vírus da dengue nas amostras de doadores (que confirma a presença de partículas virais) teria grande relevância no intuito de evitar uma possível transmissão via transfusão de sangue e hemocomponentes, principalmente para indivíduos imunocomprometidos.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

- Avaliar por ensaio imunoenzimático a presença do antígeno viral NS1 da Dengue em amostras obtidas de doadores de sangue da Fundação Hemocentro de Brasília.

### **Objetivos específicos**

- Selecionar, com base no boletim epidemiológico, o período em que as amostras que serão incluídas na pesquisa, avaliando-se os anos de 2015 a 2017;
- Calcular o número de amostras a serem testadas baseado no número total de doações no período estudado, de modo que a amostragem seja representativa;
- Recolher informações dos doadores e promover a aquisição/armazenamento das amostras que serão utilizadas;
- Determinar a presença da proteína não estrutural NS1 do vírus da Dengue em amostras de soro;
- Determinar a prevalência estimada, baseado no número total de doações realizadas no período estudado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Boletim de Hemovigilância nº 7**. Brasília, 2015.

COSTA, Antonio Charlys da. **Caracterização molecular do vírus da dengue pela análise do genoma completo viral em amostras de doadores e receptores de sangue nos estados de Pernambuco e Rio de Janeiro**. 2017. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DA COSTA, Vivaldo G.; MARQUES-SILVA, Ariany C.; MORELI, Marcos L. A meta-analysis of the diagnostic accuracy of two commercial NS1 antigen ELISA tests for early dengue virus detection. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94655, 2014.

LEVI, José Eduardo. Emerging Infectious Agents and Blood Safety in Latin America. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. 71, p.1-5, 2018.

MANIERO, Viviane C. et al. Dengue, chikungunya e zika vírus no brasil: situação epidemiológica, aspectos clínicos e medidas preventivas. **Almanaque Multidisciplinar de Pesquisa**, v. 1, n. 1, 2016.

MATOS, Desiree et al. Probable and possible transfusion-transmitted dengue associated with NS1 antigen–negative but RNA confirmed-positive red blood cells. **Transfusion**, v. 56, n. 1, p. 215-222, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Manual técnico para a investigação da transmissão de doenças pelo sangue**. 2004.

OH, Han Boon et al. Bitten by a bug or a bag? Transfusion-transmitted dengue: a rare complication in the bleeding surgical patient. **Transfusion**, v. 55, n. 7, p. 1655-1661, 2015.

PORTO, Vanessa Torales. **Acurácia do teste NS1 para dengue no contexto epidemiológico brasileiro**. 2014. Tese de Mestrado. Universidade de Brasília.

RAMOS, Rafaela Rodrigues; MACHADO, Carlos José Saldanha. Uma análise espaço-temporal dos grupos de pesquisa do CNPQ: a dengue no Brasil. **Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 10, n. 18, p. 58, 2014.

SABINO, Ester C. et al. Transfusion-transmitted dengue and associated clinical symptoms during the 2012 epidemic in Brazil. **The Journal of infectious diseases**, v. 213, n. 5, p. 694-702, 2015.

SAITO, Cristhiana Kise et al. Sorologia e avaliação clínica: correlação no diagnóstico da Dengue. **CuidArte, Enferm**, v. 11, n. 1, p. 72-77, 2017.

SOLANKE, Vaishali N. et al. Early dengue diagnosis: role of rapid NS1 antigen, NS1 early ELISA, and PCR assay. **Tropical Journal of Medical Research**, v. 18, n. 2, p. 95, 2015.

VALLE, Denise; PIMENTA, Denise Nacif; DA CUNHA, Rivaldo Venâncio. **Dengue: teorias e práticas**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2015. 458p.

YOHAN, Benediktus et al. Genomic analysis of dengue virus serotype 1 (DENV-1) genotypes from Surabaya, Indonesia. **Virus genes**, p. 1-5, 2018.

ZHANG, Hao et al. 2 NS1-based tests supplying a diagnostic utility for confirming dengue 3 infection: a meta-analysis Q1. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 30, p. e1-e10, 2014.

## ARTIGO

**Título:** Prevalência do antígeno NS1 da dengue em doadores de sangue de Brasília

**Título em inglês:** Prevalence of dengue NS1 in blood donors from Brasilia.

**Autores:** Moura ACAM<sup>1</sup>, Cilião Alves DC<sup>2</sup>, Gonzaga FAC<sup>3</sup>, Pimentel BMS<sup>4</sup>, Kashima S<sup>5</sup>, Slavov SN<sup>5</sup>, Haddad R<sup>1;3</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Brasília - Faculdade de Ceilândia - UnB/FCE

<sup>2</sup>Centro Universitário UNIEURO

<sup>3</sup>Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília

<sup>4</sup>Fundação Hemocentro de Brasília

<sup>5</sup>Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

**Abstract:** Dengue virus (DENV) is an arbovirose transmitted naturally by the mosquito *Aedes aegypti*. Nevertheless, it has been discussed in the literature probable cases of DENV transmission through transfusion of blood components. Although prior clinical evaluation of donors largely avoids the donation of blood contaminated by the virus, asymptomatic patients or who conceal information at the time of clinical evaluation can donate blood containing DENV. This study aimed to evaluate the presence of DENV NS1 viral antigen in serum samples obtained from blood donors of the Hemocentro Foundation in Brasília. No positive samples were detected for DENV NS1. However statistical analysis showed that we could find a maximum prevalence until 0.55% (CI: 95%). Because it is a screening method, the use of more sensitive methods should be used as a confirmatory methodology to avoid the transfusion of contaminated blood components to receptors, often immunocompromised.

**Resumo:** O vírus da dengue (DENV) é uma arbovirose transmitida naturalmente pelo mosquito *Aedes aegypti*. Porém, tem se discutido na literatura prováveis casos de transmissão do DENV através da transfusão de hemocomponentes. Apesar da avaliação clínica prévia dos doadores evitar, em grande parte, a doação de sangue contaminado pelo vírus, pacientes assintomáticos ou que ocultam informações no momento da avaliação clínica podem doar sangue contendo o DENV. Este estudo buscou avaliar a presença do antígeno viral NS1 do DENV em amostras de soro obtidas de doadores de sangue da Fundação Hemocentro de Brasília. Não foi detectada nenhuma amostra positiva para o NS1 do DENV. Entretanto a análise estatística demonstrou que poderíamos encontrar uma prevalência máxima de até 0,55% (IC: 95%). Por se tratar de um método de triagem, a utilização de métodos confirmatórios deve ser pensada em estudos futuros, para se ter resultados mais conclusivos.

## **Introdução**

A Dengue é uma arbovirose do gênero *Flavivirus*, esférico, com nucleocapsídeo icosaédrico e uma única fita de RNA viral. Esse genoma de cadeia simples possui uma única ORF (*open read frame* - quadro aberto de leitura) com dois conjuntos de genes: o primeiro com três genes responsáveis por produzir proteínas estruturais e o segundo com sete genes responsáveis em codificar proteínas não estruturais (NS).<sup>1</sup> Dentre as proteínas não estruturais, está a NS1, foco deste estudo, primordial para a replicação do vírus da dengue (DENV) e que pode ser encontrada na superfície e interior de células, assim como circulante no soro do indivíduo infectado.<sup>2</sup> A janela de detecção para este antígeno no soro de indivíduos infectados é de até 12 dias após o contágio. Além disso, o pico de detecção ocorre no quarto dia a partir do início dos sintomas.<sup>3</sup> Sendo assim, esse antígeno é um biomarcador precoce da infecção pelo DENV.<sup>4</sup>

O DENV, é subdividido de acordo com particularidades antigênicas em DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4, e ambos são encontrados no território brasileiro.<sup>5</sup> Os primeiros sintomas dessa virose infecciosa, mas não contagiosa, inicia-se após três dias do contato com o vírus e perduram pelas próximas duas semanas. As

manifestações clínicas mais comuns são: dores de cabeça, mal-estar, febre entre 39 a 40 °C, petéquias, dor retro orbital, vermelhidão na parte superior do corpo, mialgia e artralgia. Essa virose apresenta ampla apresentação clínica, e os portadores do vírus podem ser assintomáticos, sintomáticos comuns, graves e letais.<sup>6</sup>

Por se tratar de uma arbovirose, parte de seu ciclo de replicação ocorre em um vetor, principal responsável pela transmissão. No caso do DENV, o vetor é o *Aedes aegypti*. Contudo, é comprovada na literatura a possibilidade da transmissão por outras vias, dentre elas a transmissão por transfusão sanguínea. Durante uma transfusão, espera-se que o procedimento proporcione segurança, ou seja, não se encontre nenhum tipo de antígeno potencialmente perigoso no hemocomponente fornecido. Atualmente é comprovada a possibilidade de transmissão do DENV por meio da transfusão, porém faltam informações quanto à efetividade da infecção no receptor.<sup>7</sup>

Atualmente duas notas técnicas (Nota Técnica Conjunta ANVISA/SAS/MS nº 011/2017 e a Nota Técnica Conjunta ANVISA/SAS/MS nº 002-2016) auxiliam na triagem clínica da infecção das arboviroses antes da doação de sangue.<sup>8,9</sup> A similaridade de sintomas de Dengue, Zika, Febre Amarela e Chikungunya, faz com que a utilização de tais critérios leve à diminuição das possibilidades de captação de sangue de potenciais doadores infectados pelo DENV. Porém, por muitas vezes os indivíduos (e potenciais doadores) infectados pelo DENV não apresentam sintomas, dificultando o diagnóstico e a prevenção da transmissão pela transfusão.<sup>10</sup> Uma vez que não existe triagem sorológica para o DENV, a possibilidade de captação de sangue contaminado não pode ser descartada.

## **Objetivo**

Este trabalho visa avaliar, por ensaio imunoenzimático, a presença do antígeno viral NS1 do DENV em amostras obtidas de doadores de sangue da Fundação Hemocentro de Brasília.

## **Materiais e Método**

### *Período estudado*

Para determinar o período de estudo, dados de casos notificados de dengue foram obtidos dos Informativos Epidemiológicos de Dengue, Chikungunya e Zika da

Secretaria do Estado de Saúde do Distrito Federal, durante os anos de 2015 a 2017. Esses informativos utilizam dados obtidos do Sistema de Informação de Agravos de Notificação, SINAN.

#### *Cálculo amostral*

Durante o período escolhido para o estudo, houve 28.238 doações voluntárias de sangue para a Fundação Hemocentro de Brasília. Com auxílio de uma calculadora epidemiológica (<http://www.winepi.net/>)<sup>11</sup> foi realizado o cálculo amostral para determinação do tamanho mínimo de amostras que deveriam ser utilizadas para que os dados fossem representativos. Como parâmetros foram utilizados: um Intervalo de Confiança (IC) de 95% e erro de 1%.

#### *Coleta das amostras*

Foram obtidas 546 amostras de soro que estavam es tocadas na soroteca da Fundação Hemocentro de Brasília, para fins de retrovigilância (Figura 2). Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em seres humanos (protocolo CAAE: 62718016.0.3001.5440 – Anexo II).

#### *Ensaio imunoenzimático (ELISA) para o antígeno NS1 do DENV*

As amostras foram analisadas com o kit *Platelia*™ Dengue NS1 Ag (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, Califórnia, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A leitura da densidade óptica foi realizada pelo equipamento *BioTek*™ *ELx800*™ *Absorbance Microplate Readers* e com o software *Gen5*™ Version 2.09 ajustando a leitura em 450/620 nm. Sendo a visualização real em 450 nm, e a de 620 nm é para caso haja interferentes na primeira leitura, ou seja, uma forma de controle de qualidade interno.

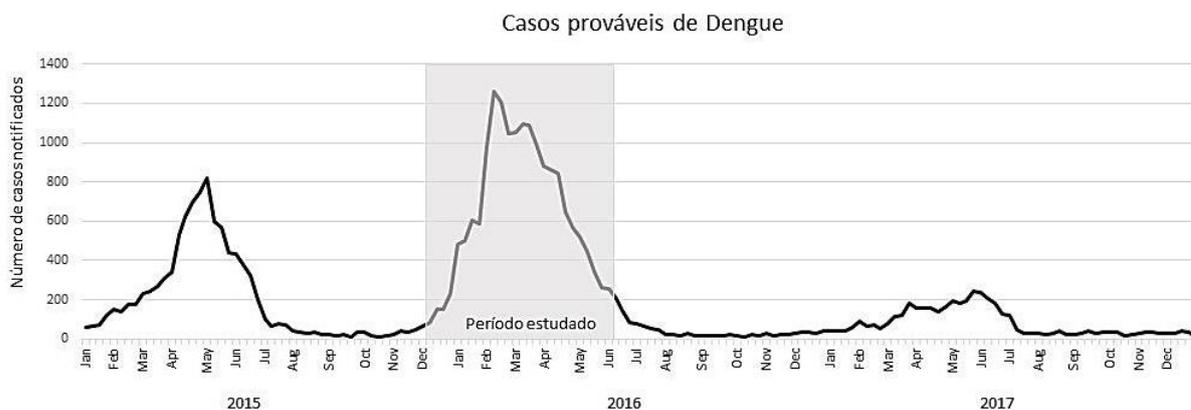
#### *Análise estatística*

Uma calculadora epidemiológica (<http://www.winepi.net/>)<sup>11</sup> foi utilizada para calcular a prevalência máxima esperada do antígeno NS1 considerando a população total de doadores de sangue no período estudado (28.238 doadores). Para este

cálculo, foi considerado, o IC de 95%, a sensibilidade de 91% e a especificidade de 99,9%, de acordo com as especificações do fabricante do kit utilizado.

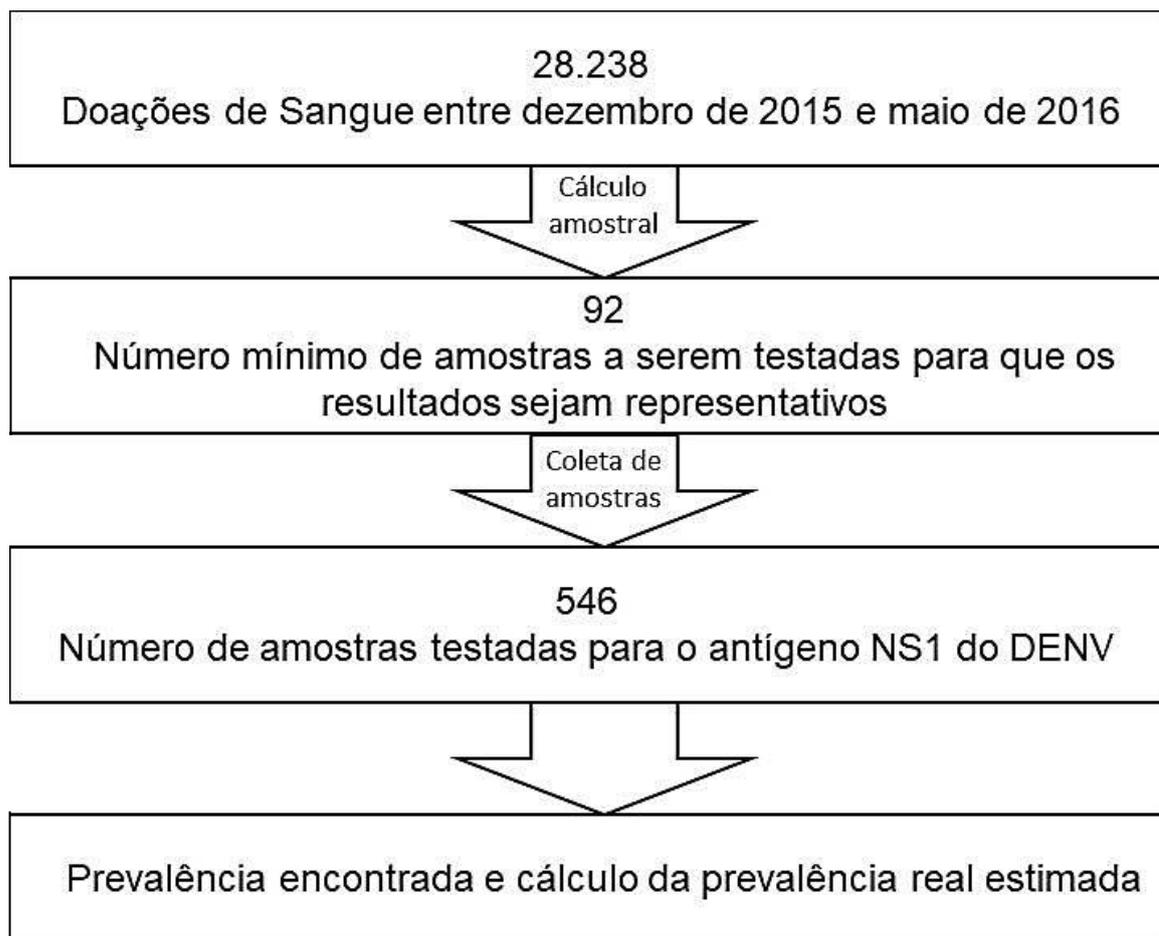
## Resultados

Conforme a avaliação do número de casos prováveis de dengue baseado no Informativo Epidemiológico de Dengue, Chikungunya e Zika da Secretaria do Estado de Saúde do Distrito Federal, durante os anos de 2015 a 2017, o período de maior número de casos notificados de dengue (período de surto) foi identificado (dezembro de 2015 a maio de 2016) e as amostras deste período foram utilizadas (Figura 1).



**Figura 1.** Determinação do período de estudo. O número de casos prováveis de dengue foi baseado no Informativo Epidemiológico de Dengue, Chikungunya e Zika da Secretaria do Estado de Saúde do Distrito Federal, durante os anos de 2015 a 2017. Observa-se na caixa cinza o período de maior número de casos reportados; neste período as amostras foram obtidas.

A prevalência esperada utilizada para o cálculo amostral foi de 0,24%. Tal prevalência foi determinada a partir de estudos no Brasil que mostram que a prevalência do RNA do DENV em doadores de sangue é de 0,65%<sup>12</sup>; uma vez que outro estudo mostra que somente 37,7%<sup>13</sup> das amostras positivas para RNA do DENV são positivas para o NS1, a prevalência esperada seria de 0,24%. Assim, o número mínimo de amostras a serem testadas foi de 92 amostras (Figura 2).



**Figura 2.** Estratégia experimental. Após identificação do período com maior número de casos notificados de dengue, foi realizado o cálculo amostral, a coleta das amostras, a detecção e determinação da prevalência do antígeno NS1.

Das 546 amostras de soro avaliadas, 382 amostras obtidas de doadores do sexo masculino (65,8%) e 164 de doadores do sexo feminino (34,2%). A média de idade dos homens foi de aproximadamente 36 anos e das mulheres de 33 anos (Tabela 1). O antígeno NS1 não foi encontrado em nenhuma das amostras testadas. Porém, considerando o número de doadores de sangue no período do estudo (28.238 doadores), a análise estatística realizada demonstrou que a prevalência máxima esperada para a presença do antígeno NS1 foi de 0,55% (IC: 95%) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Cálculo de característica da amostragem.

|                              | Gênero       |              |              | Prevalência real estimada (IC: 95%)** |
|------------------------------|--------------|--------------|--------------|---------------------------------------|
|                              | Homens       | Mulheres     | Total        |                                       |
| <b>N</b>                     | 382 (65,8%)  | 164 (34,2%)  | 546 (100%)   | -----                                 |
| <b>Média de idade (± DP)</b> | 36,1 (±10,8) | 33,2 (±10,3) | 34,7 (±10,5) | -----                                 |
| <b>DENV NS1</b>              | 0 (0.00%)    | 0 (0.00%)    | 0 (0.00%)*   | 0.00% (0.00 a 0.55%)                  |

DP: Desvio Padrão; IC: intervalo de confiança.

\*Prevalência aparente encontrada neste estudo.

\*\* Prevalência esperada considerando 28238 doadores de sangue.

## Discussão

Não foi encontrada nenhuma amostra positiva para a presença do antígeno NS1 nas amostras testadas. Sendo assim, nenhum dos doadores estava com o vírus circulante no momento da doação. Nosso resultado vai de encontro com outros estudos que também avaliaram a presença do antígeno NS1 em doadores de sangue. Na Austrália e na Índia não foram observadas amostras positivas para este marcador.<sup>14,15</sup> Por outro lado, na Arábia Saudita foi observada positividade para este antígeno em 5,3% dos doadores de sangue do banco estudado.<sup>16</sup>

Porém, mesmo que não tenhamos encontrado amostras positivas para NS1, não podemos ignorar as evidências na literatura quanto à possibilidade da transmissão do DENV por transfusão de hemocomponentes, devido às limitações da metodologia utilizada neste estudo. A metodologia utilizada (ELISA) possui uma grande gama de interferentes que podem influenciar nos resultados finais, dentre elas: i) a sensibilidade variável de acordo com o subtipo do DENV (1/4); ii) o fenômeno da imunoprecipitação que ocorre nas infecções secundárias devido ao paciente já ter desenvolvido anticorpos na primária. A presença concomitante de NS1 e anticorpos originados devido à primeira infecção faz com que ocorra a formação de um imunocomplexo, diminuindo a exatidão do teste por causa da não captura do antígeno pelo anticorpo da placa.<sup>17</sup>

Apesar de este teste ser considerado um bom meio de triagem para diagnóstico da presença de DENV, em órgãos públicos ou privados,<sup>18</sup> estudos comparativos demonstraram uma alta sensibilidade, principalmente no subtipo DENV1 com decréscimo nos outros subtipos, e uma especificidade questionável no seu desempenho geral. A variação na sensibilidade pode ser explicada pelos fatores antigênicos diferentes dos subtipos. A sensibilidade do NS1 poderá variar seus resultados de acordo com a viremia e da resposta humoral do paciente com a virose.<sup>19</sup>

Estudos mostram que muitas vezes a detecção do antígeno NS1 pode falhar mesmo na presença do vírus. Um estudo desenvolvido em Porto Rico, concluiu que apenas 20% dos pacientes que apresentaram RNA viral positivos também foram positivos para o NS1, expondo assim, uma falha na metodologia.<sup>7</sup> Ainda, outro estudo realizado no Brasil, mostrou que somente 37,7% das amostras que apresentaram positividade para o RNA viral apresentaram positividade para o antígeno NS1.<sup>13</sup>

Apesar de não detectarmos a presença do antígeno NS1, a análise estatística mostrou que existe a possibilidade de se encontrar o antígeno em 0,55% dos doadores no período estudado. A prevalência da transmissão de dengue por transfusão é rara por todo o mundo. Porém, ainda assim é um assunto preocupante. Em um estudo desenvolvido em Cingapura, durante um período de surto, foi registrado três casos de transmissão do vírus por transfusão de hemocomponente. O sangue de um doador que no momento da doação era assintomático, e que desenvolveu sintomas 02 (dois) dias após a doação, foi transfundido em 03 (três) pacientes diferentes. Isso demonstra a fragilidade da segurança nos bancos de sangue. Além deste caso, existiram relatos de transmissão do vírus por origem nosocomial, por ferimentos de agulha e em transplante de órgãos.<sup>20</sup>

Já em outro estudo desenvolvido no Brasil, nos estados do rio de janeiro e recife, em 2012, em um período epidêmico, foi demonstrado que 1 a 2% das bolsas de sangue doadas poderiam ser positivas para o RNA-DENV, estando estes doadores possivelmente assintomáticos. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que 16 doações positivas para RNA-DENV chegaram a receptores e foram utilizadas.

Foram encontrados 06 (seis) casos prováveis de dengue transmitidos por transfusão sanguínea sem que, felizmente, os receptores tivessem desenvolvido sintomas expressivos da virose.<sup>12</sup>

## **Conclusões**

A inclusão das arboviroses na lista de doenças triadas em bancos de sangue deveria ser discutida, principalmente em regiões endêmicas e em certos períodos anuais em que ocorrem surtos, como ocorreu no Distrito Federal no período analisado neste estudo. Salientando a importância de não se omitir informações durante a avaliação clínica dos possíveis doadores, pois é neste momento decisivo em que se tem a permissão para o indivíduo realizar a coleta. Além disso, é de suma importância à utilização de técnicas com alta sensibilidade, especificidade e baixo custo em bancos de sangue, para preservar a segurança da utilização dos hemocomponentes fornecidos por estes bancos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yohan B, Wardhani P, Trimarsanto H, Arvati A, Sasmono RT. Genomic analysis of dengue virus serotype 1 (DENV-1) genotypes from Surabaya, Indonesia. *Virus genes*. 2018 Jun; 54(3): 461-5. PMID: 29616396.
2. Solanke VN, Karmarkar MG, Mehta PR. Early dengue diagnosis: role of rapid NS1 antigen, NS1 early ELISA, and PCR assay. *Trop J Med Res*. 2015 Jun; 18(2): 95-9. ISSN: 1119-0388.
3. Nogueira RMR, Santos FB. Diagnóstico Laboratorial da Dengue. In: Valle D, Pimenta DN, Cunha RV. *Dengue: teorias e práticas* [online]. Rio de Janeiro. Editora FIOCRUZ; 2015. p. 205-219. ISBN: 9788575414569.
4. Silva MS. Estudo de casos suspeitos de dengue negativos no teste sorológico para detecção do antígeno NS1: falha no diagnóstico ou emergência de outras arboviroses?. 2017. [dissertação]. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas; 2017.
5. Costa AC. Caracterização molecular do vírus da dengue pela análise do genoma completo viral em amostras de doadores e receptores de sangue nos estados de Pernambuco e Rio de Janeiro. 2017. [dissertação]. Tese de Doutorado em Doenças Tropicais e Saúde Internacional, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo; 2017.
6. Lee IK, Huang CH, Huang WC, et al. Prognostic Factors in Adult Patients with Dengue: Developing Risk Scoring Models and Emphasizing Factors Associated with Death  $\leq 7$  Days after Illness Onset and  $\leq 3$  Days after Presentation. *J Clin Med*. 2018 Oct; 7(11). PMID: 30373324.
7. Matos D, Tomashek KM, Perez-Padilla J, et al. Probable and possible transfusion-transmitted dengue associated with NS1 antigen–negative but RNA confirmed-positive red blood cells. *Transfusion*. 2016; 56 (1): 215-22. PMID: 26469514.
8. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica Conjunta ANVISA/SAS/MS nº 011/2017. Brasília: ANVISA; 2017.

9. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica Conjunta ANVISA/SAS/MS nº 002-2016. Brasília: ANVISA; 2016.
10. Levi JE. Emerging Infectious Agents and Blood Safety in Latin America. *Front Med (Lausanne)*. 2018 Mar; 5 (71): 1-5. PMID: 29594126.
11. de Blas I. (2006). Win Epi: Working in Epidemiology (versão 2.0) [Software] Faculdade de Veterinária, Universidade de Zaragoza, Espanha. Disponível em: <http://www.winepi.net/sp/index.htm>.
12. Sabino EC, Loureiro P, Lopes ME, et al. Transfusion-transmitted dengue and associated clinical symptoms during the 2012 epidemic in Brazil. *J Infect Dis*. 2016 Mar; 213 (5): 694-702. PMID: 26908780.
13. Felix AC, Romano CM, Centrone CC, et al. Low Sensitivity of NS1 Protein Tests Evidenced during a Dengue Type 2 Virus Outbreak in Santos, Brazil, in 2010. *Clin Vaccine Immunol*. 2012 Dec; 19(12): 1972–1976. PMID: 23100478.
14. Rooks K, Seed CR, Fryk JJ, et al. Mitigating the Risk of Transfusion-Transmitted Dengue in Australia. *J Blood Transfus*. 2016;2016:3059848. Epub 2016 Nov 13. PMID:27957384.
15. Mangwana S. Dengue viremia in blood donors in Northern India: Challenges of emerging dengue outbreaks to blood transfusion safety. *Asian J Transfus Sci*. 2015 Jul-Dec; 9(2):177-80. PMID: 26420940.
16. Ashshi AM, Alghamdi S, El-Shemi AG, et al. Seroprevalence of Asymptomatic Dengue Virus Infection and Its Antibodies Among Healthy/Eligible Saudi Blood Donors: Findings From Holy Makkah City. *Virology (Auckl)*. 2017 Feb. 24(8): 1-5. PMID: 28469422.
17. da Costa VG, Marques-Silva AC, Moreli ML. A Meta-Analysis of the Diagnostic Accuracy of Two Commercial NS1 Antigen ELISA Tests for Early Dengue Virus Detection. *PLoS One*. 2014 Abril; 9(4): e94655. PMID: 24728377.

**18.** Porto, VT. Acurácia do teste NS1 para dengue no contexto epidemiológico brasileiro. 2014. [dissertação]. Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Universidade de Brasília; 2014.

**19.** Neralwar A, Banjare B, Barapatre R. Detection of NS1 antigen, IgM antibody for the diagnosis of dengue infection in patients with acute febrile illness. *Int J Res Med Sci.* 2017 Oct; 3 (10): 2826-30. pISSN 2320-6071, eISSN 2320-6012.

**20.** Oh HB, Muthu V, Daruwalla ZJ, Lee SY, Koay ES, Tambyah PA. Bitten by a bug or a bag? Transfusion-transmitted dengue: a rare complication in the bleeding surgical patient. *Transfusion.* 2015 Jul; 55 (7): 1655-61. PMID: 25728040.

## **ANEXO I**

### **NORMAS DO PERIÓDICO**

O Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (JBPML), continuação do Jornal Brasileiro de Patologia, de periodicidade bimestral (fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro), é o órgão oficial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML), da Sociedade Brasileira de Patologia (SBP) e da Sociedade Brasileira de Citopatologia (SBC). É indexado na Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), no Periodica e no Chemical Abstracts e é integrante da base de dados Scientific Electronic Library Online (SciELO). Destina-se à publicação de trabalhos científicos que contribuam para o desenvolvimento da área de Medicina Laboratorial e aceita as seguintes categorias: artigos originais, de revisão, de atualização, experimentais, relatos de caso, comunicações breves e cartas aos editores. Os trabalhos podem ser submetidos nos idiomas português, inglês ou espanhol, mas o texto completo será publicado apenas em inglês, com resumo em português ou espanhol.

#### **ANÁLISE DOS TRABALHOS**

O manuscrito recebido será enviado para, pelo menos, dois avaliadores independentes, pares científicos, de renome e com conhecimento específico na área contemplada pelo artigo. Após análise pelos avaliadores, o editor-chefe do JBPML entrará em contato com o autor principal comunicando os passos a serem seguidos na aceitação do trabalho para publicação ou sua eventual rejeição.

#### **ESTRUTURA DO TEXTO**

##### **Artigos originais**

São contribuições destinadas a divulgar resultados de pesquisa original que possam ser replicados. Os artigos podem conter até 4 mil palavras. A sua estrutura formal deve seguir o esquema de apresentação do texto para esse tipo de artigo: Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas.

O uso de subtítulos é recomendado, particularmente na Discussão. Implicações clínicas e limitações do estudo devem ser claramente apontadas. Sugere-se o detalhamento do tópico Material e Método. Para esses artigos, exige-se a apresentação de resumos estruturados em português e inglês, com cabeçalhos obedecendo à apresentação formal do artigo: Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências. O Abstract (resumo em inglês) deve ser precedido pelo título em inglês. As referências bibliográficas devem aparecer no final do texto, obedecendo às normas especificadas a seguir.

### **Comunicações breves**

São relatos curtos que devem apresentar: 1) dados de estudos preliminares com achados sugestivos que garantam uma investigação mais definitiva; 2) estudos de replicação; e 3) estudos negativos de tópicos importantes. Esses artigos devem ter até 1.500 palavras, incluir resumo não estruturado e, no máximo, uma tabela ou figura, além das referências bibliográficas.

### **Artigos de revisão**

**Serão aceitos apenas mediante convite.**

Avaliações críticas sistematizadas da literatura sobre determinado assunto, devem incluir conclusões e ter até 5 mil palavras. A organização do texto, com exceção de Introdução, Discussão e Conclusão, fica a critério do autor. Para esses artigos, exige-se um resumo estruturado no idioma do texto e outro em inglês. Uma lista extensa de referências bibliográficas deve aparecer no final do texto.

### **Relatos de caso**

São trabalhos de observações clínico laboratoriais originais, acompanhados de análise e discussão. Devem conter até 1.500 palavras. A estrutura deve apresentar, no mínimo, os seguintes tópicos: Introdução, Relato(s) dos(s) caso(s) e Discussão. Incluir um resumo não estruturado no idioma do texto e outro em inglês.

### **Cartas aos editores**

Inclui cartas que visam a discutir artigos recentes publicados na revista ou a relatar pesquisas originais ou achados científicos significativos. Cartas breves, com

no máximo 500 palavras (incluindo referências, sem tabelas ou figuras), serão consideradas se estiver explícita a frase “para publicação”.

## REFERÊNCIAS

As referências bibliográficas devem aparecer no final do artigo, e ser numeradas sucessivamente pela ordem em que são mencionadas pela primeira vez no texto. Devem seguir as normas do Estilo Vancouver. Os títulos dos periódicos deverão ser referidos na forma abreviada de acordo com o Index Medicus (List of Journals Indexed in Index Medicus). Se a lista de referências não seguir a norma adotada, os trabalhos serão imediatamente rejeitados, sem revisão de conteúdo.

Os autores devem certificar-se de que as referências citadas no texto constam da lista de referências com datas exatas e nomes de autores corretamente grafados. A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Comunicações pessoais, trabalhos inéditos ou em andamento poderão ser citados, quando absolutamente necessários, mas não devem ser incluídos na lista de referências bibliográficas; apenas mencionados no texto ou em nota de rodapé. A lista de referências deve seguir o estilo dos exemplos abaixo.

### Exemplos:

- **Artigos de periódicos (um só autor)**  
Fry PH. O significado da anemia falciforme no contexto da ‘política racial’ do governo brasileiro 1995-2004. *Hist Cienc Saude Manguinhos*. 2005; 12: 347-70. PubMed PMID: 16353330.
- **Artigos de periódicos (até seis autores)**  
Barbosa AJA, Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA, Lima GF Jr, Oliveira CA. Immunocytochemical identification of *Campylobacter pylori* in gastritis and correlation with culture. *Arch Pathol Lab Med*. 1988 May; 112(5): 523-5. PubMed PMID: 3282485.
- **Artigos de periódicos (mais de seis autores)**  
Rocha GA, Queiroz DM, Mendes EN, et al. Indirect immunofluorescence determination of the frequency of anti-H. pylori antibodies in Brazilian blood donors. *Braz J Med Biol Res*. 1992; 25(7): 683-9. PubMed PMID: 1342599.

- **Artigo de periódico on-line**  
Polgreen PM, Diekema DJ, Vandenberg J, et al. Risk factors for groin wound infection after femoral artery catheterization: a case-control study. Infect Control Hosp Epidemiol [Internet]. 2006 Jan; 27(1): 34-7. Disponível em: <http://www.journals.uchicago.edu/ICHE/journal/issues/v27n1/2004069/2004069.web.pdf>.
- **Livros no todo (dois autores)**  
Eyre HJ, Lange DP. Informed decisions: the complete book of cancer diagnosis, treatment, and recovery. 2nd ed. Atlanta: American Cancer Society; 2002.
- **Capítulos ou parte de livro editado por outro autor**  
Mendenhall WM. Treatment of head and neck cancer. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. Cancer: principles and practice of oncology. 9th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 729-80.
- **Parte de livro em meio eletrônico**  
São Paulo (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Tratados e organizações ambientais em matéria de meio ambiente. In: São Paulo (Estado). Entendendo o meio ambiente. São Paulo; 1999. v. 1. Disponível em: <http://www.bdt.org/sma/entendendo/atual/htm>.
- **Evento em meio eletrônico**  
Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, Lutton E, Miller J, Ryan C, Tettamanzi AG, editores. Genetic programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3-5; Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer; 2002. p. 182-91.
- **Tese ou dissertação**  
Silva MAL. Estudo da identificação de haplótipos e a relação com as manifestações clínicas em pacientes com doença falciforme. 2008. [dissertação]. Programa de pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.
- **Citações no texto**  
Devem ser identificadas por algarismos arábicos (números-índice). Podem também ser acrescentados o nome do autor e o ano. As referências com mais de um autor

devem conter o sobrenome do autor seguido da expressão et al., como, por exemplo, Higashi et al.

### **Tabelas e figuras**

As tabelas deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas por seu título, recomendando-se a não repetição dos mesmos dados em gráficos. Na montagem das tabelas, seguir as normas de apresentação tabular estabelecidas pelo Conselho Nacional de Estatística e publicadas pela Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1993).

As ilustrações (gráficos, fotografias, desenhos etc.) deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas como figuras. Devem ser suficientemente claras para permitir sua produção. Os gráficos deverão vir preparados em programa processador de gráficos. Deverão ser indicados os locais aproximados no texto onde as ilustrações serão intercaladas como figuras.

O GNPapers aceita a importação de tabelas, imagens e gráficos em arquivo eletrônico nos seguintes formatos: jpg, gif, psd, tif e png, e com resolução de no mínimo 300 dpi.

O direito à privacidade do paciente não deve ser infringido. Imagens que eventualmente permitam a identificação pessoal somente poderão ser utilizadas com consentimento por escrito do paciente ou responsável, quando da submissão do manuscrito.

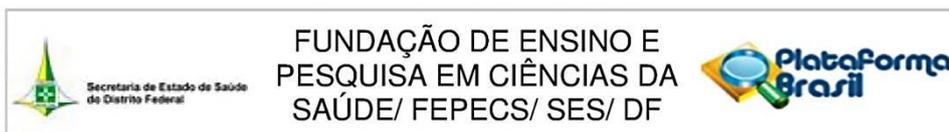
### **Abreviações e nomes de medicamentos**

As abreviações devem ser indicadas no texto no momento de sua primeira utilização. Empregar o nome genérico de medicamentos e indicar a fonte de componentes não disponíveis para prescrição.

As unidades de medida, inclusive suas abreviaturas, devem ser expressas no sistema métrico decimal e, quando o autor assim o desejar, também no Sistema Internacional (SI) entre parênteses.

## ANEXO II

### APROVAÇÃO NO CÔMITE DE ÉTICA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** TRIAGEM MOLECULAR DE VÍRUS EMERGENTES (DENGUE, CHICUNGUNYA, ZIKA VIRUS, MAYARO, HEPATITE E, PARVOVÍRUS B19 E PARVOVÍRUS 4) EM DOADORES DA FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE BRASÍLIA

**Pesquisador:** Barbara Maciel Sidou Pimentel

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 62718016.0.0000.5553

**Instituição Proponente:** FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE BRASÍLIA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.896.770

##### Apresentação do Projeto:

No Brasil, o parvovírus B19 (B19V) encontra-se distribuído por todo o território, enquanto o Parvovírus 4 (PARV4) não possui sua distribuição bem definida. Além disso, encontram-se endêmicos em diferentes regiões do país o alfavírus Mayaro (MAYV), os recém-introduzidos vírus da febre Chikungunya (CHIKV) e Zika vírus (ZIKV) (gênero Alfavírus), o vírus da Dengue (DENV) (Flavivírus) e o vírus da hepatite E (HEV) (Hepevírus). Estas infecções, na grande maioria, são transmitidas por vetores mosquitos dos gêneros Aedes spp., Culex spp. e Haemagogus spp., com a exceção do HEV que é transmitido por via fecal-oral, do B19V que é transmitido por secreção oral e verticalmente, e o PARV4 que possuem transmissão parenteral e vertical. Todos estes vírus têm grande importância para a saúde pública, devido seu potencial epidêmico, características hemorrágicas da infecção, neurovirulência, tropismo hepático, e tropismo por precursores eritrocitários. Por outro lado, uma parte significativa dos indivíduos infectados por estes vírus permanecem assintomáticos ou subclínicos, mantendo, ao mesmo tempo, altos títulos virais. Como consequência, estes indivíduos podem representar uma significativa ameaça à hemoterapia, uma vez que o vírus pode contaminar seus hemoderivados e ser transmitido para os receptores destes produtos sanguíneos. No Brasil existem poucos estudos que avaliem o risco e o impacto dos alfa-, flavi-, parvo- e hepevírus na rotina hemoterapêutica.

**Endereço:** SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS  
**Bairro:** ASA NORTE **CEP:** 70.710-904  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3325-4955 **Fax:** (33)3325-4955 **E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com

Continuação do Parecer: 1.896.770

**Objetivo da Pesquisa:**

Geral:

- Investigar a presença dos arbovírus mais relevantes dos gêneros Flavivirus (Dengue 1-4 e ZIKV), Togavirus (vírus Mayaro, vírus da Febre Chikungunya), Parvovirus (B19V e PARV4) e Hepevirus (vírus da hepatite E, HEV) em doadores de sangue da Fundação Hemocentro de Brasília.

Específicos:

- Testar 2.000 amostras de plasma de doadores de sangue retroativas estocadas no Hemocentro de Brasília do ano de 2014 e 2015 para a presença de RNA viral de DENV 1-4, MAYV, CHIKV, ZIKV e HEV, e de DNA viral de PARV4, B19V;

- Identificar a origem, classificação e as relações filogenéticas dos vírus detectados por meio da genotipagem e análise filogenética.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os sujeitos foram adequadamente identificados. Quanto aos riscos, os resultados obtidos no decorrer da pesquisa, não representam riscos de danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual dos indivíduos a serem estudados, uma vez que mesmo que sejam detectados agentes virais nas amostras dos doadores de sangue envolvidos no estudo, esses indivíduos apresentam infecções assintomáticas e autolimitadas (vírus são eliminados do organismo pelo próprio sistema imune). Como benefícios apresentados, os resultados obtidos neste estudo irão auxiliar no entendimento da patogênese da infecção assintomática destes vírus emergentes, bem como a prevalência na população estudada. Os antecedentes científicos que justificam a pesquisa foram apresentados.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

As amostras da pesquisa serão de triagem retroativa dos vírus DENV 1-4, MAYV, CHIKV, ZIKV, HEV, PARV4 e B19V e obtidas de aproximadamente 2000 doadores da Fundação Hemocentro de Brasília (armazenagem de soro ou plasma de doadores por pelo menos 6 meses). Serão incluídas amostras de doadores de sangue maiores de idade, sadios e com sorologias negativas para os vírus HTLV-1/2, HIV-1/2, HCV, HBcAg, Sífilis e tripanossomíase americana. Serão excluídos doadores com sorologia positiva para os patógenos acima referidos; não serão utilizadas amostras de doadores de sangue menores de 18 anos.

As amostras serão enviadas ao Hemocentro de Ribeirão Preto – HCFMRP/USP, Laboratório de Biologia Molecular, para as análises moleculares. Será preparado pool de amostras a partir da

**Endereço:** SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS  
**Bairro:** ASA NORTE **CEP:** 70.710-904  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3325-4955 **Fax:** (33)3325-4955 **E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com



Secretaria de Estado de Saúde  
do Distrito Federal

## FUNDAÇÃO DE ENSINO E PESQUISA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE/ FEPECS/ SES/ DF



Continuação do Parecer: 1.896.770

mistura de 50 amostras, extração de material genético DNA e RNA viral. Para a análise molecular dos vírus de RNA, será sintetizado o DNA complementar a partir do material genético total extraído e quantificado, reação de transcrição reversa e o DNA complementar estocado. Posteriormente, a identificação dos membros de cada gênero e análise filogenética.

### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Folha de rosto: Apresentado. Documento assinado pelo Diretor Executivo da Fundação Hemocentro de Brasília/DF.

Termo de Anuência de Coparticipação/Concordância: Apresentado. Documento assinado pelo Diretor e Chefe do Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto/SP.

Curriculum Vitae do(s) pesquisador(es): Apresentados.

Cronograma da Pesquisa: Apresentado.

Planilha de orçamento: Apresentada.

Dispensa TCLE: Apresentado.

Critérios de Inclusão e Exclusão: Definidos.

### **Recomendações:**

O pesquisador assume o compromisso de garantir o sigilo que assegure o anonimato e a privacidade dos sujeitos da pesquisa e a confidencialidade dos dados coletados. Os dados obtidos na pesquisa deverão ser utilizados exclusivamente para a finalidade prevista no seu protocolo, que só poderá iniciar após aprovação pelo CEP/FEPECS/SES/DF.

O pesquisador deverá encaminhar relatório parcial e final de acordo com o desenvolvimento do projeto da pesquisa.

### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

- Projeto Aprovado.

### **Considerações Finais a critério do CEP:**

### **Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|----------------|---------|----------|-------|----------|
|----------------|---------|----------|-------|----------|

**Endereço:** SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

**Bairro:** ASA NORTE

**CEP:** 70.710-904

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3325-4955

**Fax:** (33)3325-4955

**E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com



Secretaria de Estado de Saúde  
do Distrito Federal

FUNDAÇÃO DE ENSINO E  
PESQUISA EM CIÊNCIAS DA  
SAÚDE/ FEPECS/ SES/ DF



Continuação do Parecer: 1.896.770

|   |  |                        |                |        |
|---|--|------------------------|----------------|--------|
| Informações Básicas do Projeto                            | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_820280.pdf               | 25/11/2016<br>11:38:02 |                | Aceito |
| Folha de Rosto  | folha_de_rosto_nova.pdf                                    | 25/11/2016<br>11:36:43 | Rodrigo Haddad | Aceito |
| Outros  | coparticipante_nova.pdf                                    | 25/11/2016<br>11:36:07 | Rodrigo Haddad | Aceito |
| Outros  | concordancia_novo.pdf                                      | 25/11/2016<br>11:35:41 | Rodrigo Haddad | Aceito |
| Outros  | Curriculo_Svetoslav.pdf                                    | 08/11/2016<br>12:21:13 | Rodrigo Haddad | Aceito |
| Outros  | Curriculo_Simone.pdf                                       | 08/11/2016<br>12:20:58 | Rodrigo Haddad | Aceito |
| Outros  | Curriculo_Rodrigo.pdf                                      | 08/11/2016<br>12:20:43 | Rodrigo Haddad | Aceito |
| Outros  | Curriculo_Katia.pdf  | 08/11/2016<br>12:20:24 | Rodrigo Haddad | Aceito |
| Outros  | Curriculo_Evandra.pdf                                      | 08/11/2016<br>12:20:12 | Rodrigo Haddad | Aceito |
| Outros  | Curriculo_Dimas.pdf  | 08/11/2016<br>12:19:53 | Rodrigo Haddad | Aceito |
| Outros  | Curriculo_Barbara.pdf                                      | 08/11/2016<br>12:19:35 | Rodrigo Haddad | Aceito |
| Outros  | CURRICULUM_VITAE_Barbara.pdf                               | 08/11/2016<br>12:18:27 | Rodrigo Haddad | Aceito |
| Outros  | parecerCEP_hemocentroBSB.pdf                               | 08/11/2016<br>12:17:44 | Rodrigo Haddad | Aceito |
| Outros  | FUNDACAO_HEMOCENTRO_DE_BRASILIA termo de consentimento.pdf | 08/11/2016<br>12:15:45 | Rodrigo Haddad | Aceito |
| Orçamento   | Planilhadeorcamento.pdf                                    | 08/11/2016<br>12:08:59 | Rodrigo Haddad | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | dispensa_TCLE_zika.pdf                                     | 08/11/2016<br>12:08:43 | Rodrigo Haddad | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                 | Projeto_detalhado_com_Zika.docx                            | 08/11/2016<br>12:07:09 | Rodrigo Haddad | Aceito |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

**Bairro:** ASA NORTE

**CEP:** 70.710-904

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3325-4955

**Fax:** (33)3325-4955

**E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com



Secretaria de Estado de Saúde  
do Distrito Federal

FUNDAÇÃO DE ENSINO E  
PESQUISA EM CIÊNCIAS DA  
SAÚDE/ FEPECS/ SES/ DF



Continuação do Parecer: 1.896.770

BRASILIA, 23 de Janeiro de 2017

---

**Assinado por:**  
**Helio Bergo**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

**Bairro:** ASA NORTE

**CEP:** 70.710-904

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3325-4955

**Fax:** (33)3325-4955

**E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com