

**LÍGIA CAROLINA LAVEZZO**

**“Estudo de Arboviroses em Doadores de Sangue na  
Região Amazônica e em uma cidade do interior de São  
Paulo”**

**LÍGIA CAROLINA LAVEZZO**

**“Estudo de Arboviroses em Doadores de Sangue na Região  
Amazônica e em uma cidade do interior de São Paulo”**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira  
Professor Doutor  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientador

Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos  
Professor Doutor  
FAMERP – São José do Rio Preto

Dr<sup>a</sup>. Maria Roberta Fachini  
HEMOCENTRO – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 04 de Março de 2010

Lavezzo, Lígia Carolina.

Estudo de arboviroses em doadores de sangue da Região Amazônica e em uma cidade do interior de São Paulo / Lígia Carolina Lavezzo. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2010.

74 f. : il.; 30 cm.

Orientador: Maurício Lacerda Nogueira

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Arbovírus. 2. Arboviroses. 3. Doadores de sangue - Região Amazônica. 4. Doadores de sangue - São Paulo (Estado) I. Nogueira, Maurício Lacerda. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 578

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

## *DEDICATÓRIA*

---

*À minha família:*

*Pelo esforço, dedicação e compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas.*

## ***AGRADECIMENTOS***

---

- À Deus, por me permitir avançar mais uma fase em minha vida, e por, em muitos momentos aflitivos, proporcionar-me a sua paz.
- Ao Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira, pela oportunidade oferecida, pelos preciosos conhecimentos a mim concedidos, pela paciência e confiança depositada. Seus ensinamentos foram de suma importância para guiar este trabalho e para que sua execução fosse realizada da melhor maneira possível.
- À Dra. Roberta Vieira de Moraes Bronzoni pela ajuda prestada ao longo deste trabalho.
- À Dra. Márcia Speranca pelo seu auxílio e doação de amostras.
- À Silvia Helena P. Nunes, pela colaboração e pela sua amizade.
- Ao amigo Vinícius dos Santos Santana, pela indispensável participação durante a realização deste projeto. Meu eterno agradecimento.
- À amiga Ana Thereza Silveira de Moraes, pela compreensão e coleguismo, pela companhia nas horas de almoço e durante as viagens aos Congressos. Assim como à Milena, Tatiana, Danilo, Thiago, Daiane, Fernanda, Arieli, Amanda, Juliana Guerra e Leandro pela amizade, apoio e pelos bons momentos que passamos durante esses dois anos. À vocês muito obrigada!
- Aos companheiros de laboratório Rafael, Mariana, Vanessa, Adriano, Carol, Aninha, e Gislaïne.
- À vocês, meus pais, Odelbe Lavezzo e Any Ap. F. de Oliveira Lavezzo, que se doaram e que muitas vezes renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse

realizar os meus. Pela educação recebida, pelo investimento, dedicação e, por sempre me incentivarem a continuar essa jornada acadêmica.

- À minha irmã, Letícia Fernanda Lavezzo, pela sua torcida, graça e carinho.
- À minha Tia Sidinei Lavezzo, por ter me acolhido nesta caminhada. Minha eterna gratidão.
- À minha prima, Simony Lavezzo Coró, pelo companheirismo.
- Ao meu namorado, Carlos Eduardo Vendite de Assis, por seu amor, paciência, cumplicidade, e por aceitar minha ausência quando necessário.
- À Josiela Zanini, Juliana Heloisa Pine Américo, Juliana Caroline Lourenção e Amanda Aranha, minhas amigas que sempre estiveram presentes quando precisei.
- À Profa Dra Ana Maria Rodrigues Cassiolato e à Profa Dra Kátia Luciene Maltoni, responsáveis pela minha formação acadêmica e pelo incentivo à pesquisa.
- Ao Laboratório de Pesquisas em Virologia – FAMERP, pela infra-estrutura de ensino e pesquisa, essenciais para a realização desse trabalho.
- À Profa. Dra. Paula Rahal, pela atenção e coordenação do Curso de Mestrado em Microbiologia.
- À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela oportunidade de compor seu quadro discente.
- E, finalmente, à CAPES, pelo fomento da pesquisa por meio da bolsa de Mestrado.

*“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim, esquentada e esfria, aperta e depois afrouxa, aquietada e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre e amar, no meio da alegria. E ainda mais no meio da tristeza. Todo caminho da gente é resvaloso, mas cair não prejudica demais, a gente levanta, a gente sobe, a gente volta”.*

## SUMÁRIO

---

<b>Resumo</b> .....	<i>xii</i>
<b>Abstract</b> .....	<i>xiii</i>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1. Considerações Gerais.....	<b>15</b>
1.2. Arbovírus.....	<b>16</b>
1.2.1. <i>Flavivirus</i> .....	<b>16</b>
1.2.1.1. Vírus Dengue (DENV).....	<b>17</b>
1.2.1.2. Vírus da Febre Amarela (YFV).....	<b>19</b>
1.2.1.3. Vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV).....	<b>21</b>
1.2.1.4. Vírus West Nile (WNV).....	<b>23</b>
1.2.2. <i>Alphavirus</i> .....	<b>24</b>
1.2.2.1. Vírus das Encefalites Equinas do Leste, Oeste e Venezuelana .....	<b>25</b>
1.2.2.2. Vírus Mayaro (MAYV).....	<b>27</b>
1.2.3. <i>Orthobunyavirus</i> .....	<b>28</b>
1.2.3.1. Vírus Oropouche (OROV).....	<b>29</b>
1.3. Histórico de Epidemia de Dengue na Cidade de Tupã.....	<b>30</b>
1.4. Arboviroses e Transfusão Sanguinea.....	<b>31</b>
<b>2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>33</b>
<b>3. OBJETIVO</b> .....	<b>35</b>
3.1. Objetivo Geral.....	<b>36</b>
3.2. Objetivos Específicos.....	<b>36</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
4.1. Amostras Clínicas.....	<b>38</b>



4.2. Estratégia de Estudo.....	39
4.3. Extração de RNA.....	39
4.4. <i>Primers</i> .....	40
4.4.1. <i>Duplex-RT-PCR</i> para detecção de <i>Alphavirus</i> e <i>Flavivirus</i> .....	41
4.4.2. <i>Multiplex-Nested-PCR</i> para identificação de <i>Alphavirus</i> .....	41
4.4.3. <i>Multiplex-Nested-PCR</i> para identificação de <i>Flavivirus</i> .....	42
4.4.4. <i>RT-Nested-PCR</i> para a identificação do vírus Oropouche.....	42
4.4.5. Amostras de Tupã.....	43
4.4.6. Eletroforese em Gel de Agarose.....	43
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
5.1. Análise Epidemiológica das Amostras de Tupã.....	46
5.2. Análise Epidemiológica das Amostras da Região Amazônica.....	48
5.3. Diagnóstico Molecular das Arboviroses.....	50
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>57</b>
<b>9. ANEXO</b> .....	<b>71</b>

## ***LISTA DE TABELAS***

---

<b>Tabela 1.</b>	Relação dos arbovírus brasileiros pesquisados.....	<b>39</b>
<b>Tabela 2.</b>	<i>Primers</i> usados no estudo.....	<b>40</b>
<b>Tabela 3.</b>	Distribuição dos Casos Notificados ao CVE de Tupã em 2006.....	<b>46</b>
<b>Tabela 4.</b>	Análise das 205 amostras em 1220 reações.....	<b>50</b>

## *LISTA DE GRÁFICOS*

---

<b>Gráfico 1.</b>	Evolução do número de casos de dengue nas Américas de 1980 a 2007.....	<b>19</b>
<b>Gráfico 2.</b>	Casos Notificados de Dengue por Semana Epidemiológica, Tupã, 2006.....	<b>31</b>
<b>Gráfico 3.</b>	Distribuição das Amostras de Tupã em relação à Faixa Etária.....	<b>47</b>
<b>Gráfico 4.</b>	Distribuição das Amostras de Tupã em relação ao Gênero.....	<b>47</b>
<b>Gráfico 5.</b>	Distribuição das Amostras da Região Amazônica em Relação à Faixa Etária.....	<b>48</b>
<b>Gráfico 6.</b>	Distribuição das Amostras da Região Amazônia em Relação ao Gênero.....	<b>49</b>
<b>Gráfico 7.</b>	Distribuição das Amostras da Região Amazônica em Relação ao Tempo de Moradia.....	<b>49</b>
<b>Gráfico 8.</b>	Casos de Doadores da Região Amazônica com Episódios de Malária.....	<b>50</b>

## **LISTA DE FIGURAS**

---

<b>Figura 1.</b>	Mapa do Brasil dividido em 5 regiões.....	<b>16</b>
<b>Figura 2.</b>	Desenho mostrando a morfologia do virion de um Flavivirus.....	<b>17</b>
<b>Figura 3.</b>	Mapa da distribuição mundial do vírus e do seu vetor em 2008.....	<b>18</b>
<b>Figura 4.</b>	Zonas endêmicas de Febre Amarela.....	<b>21</b>
<b>Figura 5.</b>	Distribuição de SLEV em humanos de 1964 a 2006 nos EUA.....	<b>22</b>
<b>Figura 6.</b>	Esquema de um Alphavirus.....	<b>24</b>
<b>Figura 7.</b>	Distribuição da encefalite equina do leste no Brasil.....	<b>25</b>
<b>Figura 8.</b>	Distribuição da encefalite equina do oeste nas Américas.....	<b>26</b>
<b>Figura 9.</b>	Desenho mostrando a morfologia do vírus da família <i>Bunyaviridae</i> .....	<b>28</b>
<b>Figura 10.</b>	Localização da cidade de Tupã no Estado de São Paulo.....	<b>30</b>
<b>Figura 11.</b>	Casos de WNV em doadores de sangue nos EUA.....	<b>32</b>
<b>Figura 12.</b>	Mapa mostrando a localização das cidades de Rio Branco/AC e Belém/PA em relação à Região Norte do Brasil.....	<b>38</b>
<b>Figura 13.</b>	Eletroforese em gel de agarose.....	<b>44</b>

## ***LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS***

---

μM	Micromolar
μl	Microlitro
°C	Graus Celsius
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AC	Acre
AURAV	Vírus Aura
CDC	“Centers for Disease Control and Prevention”
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
D-RT-PCR	<i>Duplex</i> -RT-PCR
DENV	Vírus Dengue
DENV-1	Dengue Sorotipo 1
DENV-2	Dengue Sorotipo 2
DENV-3	Dengue Sorotipo 3
DENV-4	Dengue Sorotipo 4
DH	Dengue Hemorrágico
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	“DeoxynucleosideTriphosphate”
DTT	“Dithiothreitol”
EDTA	Ácido etileno-diamino tetracético
EEEV	Vírus da Encefalite Equina do Leste
EEL	Encefalite Equina do Leste
EEO	Encefalite Equina do Oeste

EEV	Encefalite Equina Venezuelana
EUA	Estados Unidos da América
FAMEMA	Faculdade de Medicina de Marília
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
hab	Habitantes
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	“Human Immunodeficiency Virus”
HTLV	Vírus T-linfotrópicos humanos
IB	Índice de Breteau
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEC	Instituto Evandro Chagas
ILHV	Vírus Ilhéus
Kb	Quilobases
KCl	Cloreto de Potássio
KDa	Quilodalton
km	Quilômetro
km <sup>2</sup>	Quilômetro Quadrado
M	Molar
MAYV	Vírus Mayaro
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro

mm	Milimetro
mM	Milimolar
M-N-PCR	<i>Multiplex-Nested-PCR</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NCR	Região Não Codificante
nm	Nanômetro
N-PCR	<i>Nested-PCR</i>
ORF	“Open Reading Frame”
OROV	Vírus Oropouche
PA	Pará
pb	Pares de Base
PCR	“Polymerase chain reaction”
pH	Potencial Hidrogeniônico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido Ribonucléico
ROCV	Vírus Rocio
RT-PCR	“Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction”
SES	Secretaria Estadual da Saúde
SLEV	Vírus da Encefalite de Saint Louis
SP	São Paulo
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias
TMA	“Transcription-Mediated Amplification”
U	Unidade

UV	Ultravioleta
VEEV	Vírus da Encefalite Equina Venezuelana
WEEV	Vírus da Encefalite Equina do Oeste
WHO	“World Health Organization”
WNV	Vírus do Oeste do Nilo
YFV	Vírus da Febre Amarela



## RESUMO

---

O Brasil é um país de dimensões continentais, com 8.512.000 km<sup>2</sup>, tem a maioria de seu território situado em área tropical, que associado a grande diversidade de flora e fauna, o que torna apropriada à ocorrência de zoonoses transmitidas por artropodes. Estudos sobre arbovírus na região, pelo Instituto Evandro Chagas, em 44 anos (1954-1998) identificaram um grande número de vírus, e pelo menos 187 diferentes arboviroses foram isoladas.

A prevalência mundial de arboviroses cresceu dramaticamente nas últimas décadas, e nas áreas onde estas doenças são endêmicas, a transmissão por transfusão dificilmente é investigada. A preocupação com a transmissão de arboviroses, principalmente do Vírus Dengue (DENV), por transfusão sanguínea aumentou após a documentação da transmissão de West Nile Vírus (WNV) por transfusão nos EUA.

DENV e WNV são semelhantes em alguns aspectos, o que suporta a hipótese de que dengue possa ser transmitida por transfusão sanguínea: são eficientemente transmitidos ao homem através da picada de mosquitos infectados; grande proporção das infecções é assintomática; níveis de viremia durante a fase de incubação pode exceder 10<sup>6</sup> virions por mL, e a transmissão de ambos foi documentada após transplante de órgão e em acidentes com profissionais da saúde.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar a presença de arboviroses em 205 amostras clínicas de doadores de sangue da Região Amazônica e em amostras obtidas durante uma epidemia de Dengue, em 2006, na cidade de Tupã/SP. O RNA viral foi extraído, *Multiplex-Nested-PCR* foi realizada com o uso de *primers* gênero e espécie-específico para *Flavivirus*, *Alphavirus*, e, para a detecção e identificação do vírus Oropouche, realizou-se RT-Nested-PCR usando *primers* que se ligam no segmento S do genoma viral.

Apesar da complexidade e número, a transmissão de arbovírus por transfusão sanguínea não foi detectada, sugerindo que o evento é raro. Diante disto, mais estudos são necessários a fim de que se avalie a prevalência de amostras virêmicas em doadores de sangue em um maior número de amostras e em outras regiões do país. É imprescindível que se estabeleçam as reais taxas de transmissão através de doadores virêmicos para que se possa, então, avaliar as conseqüências clínicas para o receptor e para prevenção de possíveis arboviroses transfusionais.

**Palavras-chaves:** Arbovírus, Doadores de Sangue, Região Amazônica

## **ABSTRACT**

---

Brazil is a large country (8.512.000 km<sup>2</sup>), situated in a predominantly tropical area, most of the country has a tropical climate and a large diversity of plants and animals, thus providing a suitable place for the occurrence of zoonoses caused by arthropod-borne viruses. Studies in this region, conducted by the Institute Evandro Chagas, in 44 years (1954-1998), identified a large number of viruses. At least 187 arboviruses were isolated.

The global incidence of arboviruses has been increasing dramatically recently, and in areas where these diseases are endemic, however, transfusion transmission of the agent is rarely investigated. Concerns about potential transmission of DENV and other arboviruses by blood transfusions increased after documentation of transfusion-transmitted West Nile Virus (WNV) during epidemics in the United State.

DENV and WNV are similar in some aspects, supported by the hypothesis that dengue can be TT: both flaviviruses are efficiently transmitted to humans via the bite of infected mosquitoes; a large proportion of infections are asymptomatic; levels of viremia during the incubation phase can exceed 10<sup>6</sup> virions per mL; and the transmission of both has been documented after organ transplantation and health care worker accidents.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the potential for arbovirus transmission in 205 serum samples of blood donors from the Amazon region and from a DENV outbreak in Tupã, a small city in São Paulo State. The viral RNA was extracted, a *Multiplex-Nested-PCR* was performed using *Flavivirus*, *Alphavirus* generic and specie-specific *primers*, and, for Oropouche detection, a RT-Nested-PCR was performed using *primers* that anneal in the S segment of *Orthobunyavirus*.

Despite the complexity and number, the transfusion-transmitted was not detected, suggesting that this is a rare event. Further studies are needed to evaluate the rates of viremia in a large number of blood donors samples and in other regions. It is essential to establish the real transmission rates by asymptomatic viremic donors, thus we can estimate the clinical consequences to recipient health, and to prevent the risk of arboviruses transmission by blood transfusion.

**Key words:** Arboviruses, Blood Donors, Amazon Region

## ***INTRODUÇÃO***

---

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Considerações Gerais:

O Brasil é um país de dimensões continentais, com 8.512.000 km<sup>2</sup>, tem a maioria de seu território situado em área tropical, que associado a grande diversidade de flora e fauna, o que torna apropriada à ocorrência de zoonoses transmitidas por artrópodes. O país pode ser dividido em 5 regiões de acordo com sua vegetação. Uma área de floresta tropical remanescente nas costas leste, sudeste e sul, denominada Mata Atlântica; no centro oeste uma extensa região alagada denominada Pantanal mato-grossense e sul mato-grossense; no Planalto Central uma área conhecida por Cerrado; no nordeste, a Caatinga e uma extensa área de floresta tropical denominada Floresta Amazônica (Figura 1). A área da Floresta Amazônica ocupa 59% do território nacional, aproximadamente 5 milhões de km<sup>2</sup>, abrangendo 8 Estados brasileiros, sendo 7 da região norte e 1 da região nordeste (FIGUEIREDO, 2007). Estudos sobre arbovírus na região, pelo Instituto Evandro Chagas, em 44 anos (1954-1998) identificaram um grande número de vírus, e pelo menos 187 diferentes arboviroses foram isoladas (IEC, 1999).

As arboviroses são doenças transmitidas por artrópodes e possuem distribuição predominantemente tropical causadas por um grupo heterogêneo de vírus, dos quais são conhecidos aproximadamente 130 tipos. Os arbovírus (de “arthropod borne virus”) reproduzem-se no interior dos vetores e são transmitidos pela picada dos insetos infectados nos hospedeiros vertebrados. No Brasil, os vírus pertencentes aos gêneros *Flavivirus*, *Bunyavirus* e *Alphavirus* são os mais importantes causadores de surtos ou epidemias (PINHEIRO, 1982; FIGUEIREDO, 1994; VASCONCELOS et al., 1992).

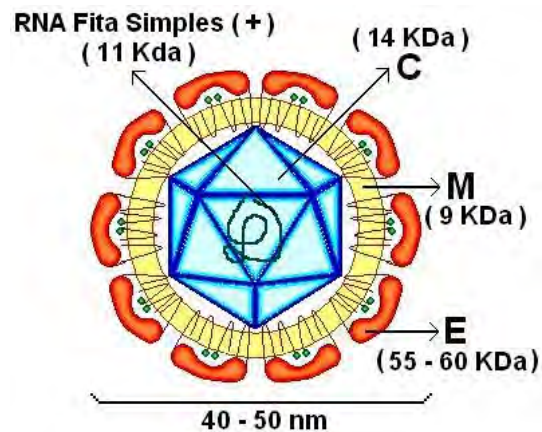


**Figura 1.** Mapa do Brasil dividido em 5 regiões (FIGUEIREDO, 2000).

## 1.2. Arbovírus

### 1.2.1. *Flavivirus*:

Os *Flavivirus* são vírus esféricos, envelopados, medindo apenas 40 a 60 nm de diâmetro e possuem projeções na superfície do envoltório (Figura 2). Apresentam fita de RNA única, de polaridade positiva que possui dez genes, na seguinte ordem 5' –C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'; os quais codificam três proteínas estruturais (E, prM, C) e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (FONSECA, 2005). Muitos destes vírus são zoonóticos no meio silvestre e podem, eventualmente, infectar o homem, como os vírus Rocio (ROCV), Ilhéus (ILHV), Febre Amarela (YFV) e Dengue (DENV) (DEGALLIER, 1998). Infecções por DENV têm sido relatadas em mais de 100 países (GUBLER, 2002), possui uma ampla distribuição geográfica, cocirculação de múltiplos serotipos, sendo, desta forma, o mais importante arbovírus em saúde pública (WILDER-SMITH et al., 2009).



**Figura 2:** Desenho mostrando a morfologia do virion de um Flavivirus e suas principais proteínas estruturais. Em C: proteína do nucleocápside; M, proteína de membrana e E, proteína do envelope (BATISTA, 2007).

### 1.2.1.1. Vírus Dengue (DENV):

Vírus esférico, envelopado, possui o RNA viral envolto por um nucleocapsídeo icosaédrico com 30 nm de diâmetro, coberto por um envelope lipídico que confere ao virion, um tamanho final de 50 a 60 nm de diâmetro (HENCHAL & PUTNAK 1990). Pertence ao mesmo gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae* de outros vírus responsáveis por doença no homem, entre os quais o West Nile, Rocio, da Febre Amarela e o da Encefalite de Saint Louis.

Atualmente são conhecidos quatro sorotipos, antigenicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Não existe imunidade cruzada, isto é, a infecção por um dos sorotipos só confere imunidade permanente, ou no mínimo duradoura, para aquele sorotipo. Clinicamente, as manifestações variam de infecção assintomática, síndrome viral, inespecífica e benigna, até um quadro grave e fatal de doença hemorrágica com choque. São fatores de risco para casos graves: a cepa do sorotipo do vírus infectante, o estado imunitário e genético do paciente, a concomitância com outras doenças e a infecção prévia por outro sorotipo viral da doença (PINHEIRO et al., 1996).

O vírus é mantido em um ciclo de transmissão urbana: “homem – mosquito – homem”, principalmente através da fêmea do mosquito *Aedes aegypti*. Depois de infectada, e após 8 a 12 dias de incubação do vírus, a fêmea que é hematófaga, passa a transmitir o vírus, ao picar o ser humano para se alimentar. A manutenção do vírus na natureza se dá através d

transmissão transovariana, assim como pela transmissão sexual (RODHAIN & ROSEN, 1997).

Os principais vetores são os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, embora o vírus já tenha sido isolado de outras espécies. O mosquito *Aedes aegypti* é o mais importante vetor devido a sua antropofilia e a seus habitats urbano-domésticos. Os mosquitos adultos possuem pequenos raios de ação, mantendo-se, em geral, toda a vida, a uma distância não superior a 200 metros dos locais de oviposição. O *Aedes albopictus* devido aos seus habitats rurais, silvestres e, transmissão transovariana mais freqüente, tem importância como potencial causador ou mantenedor de epidemias pelo DENV. Esse mosquito é oriundo da Ásia Oriental e Pacífico Sul, tendo sido introduzido nas Américas através das rotas do comércio internacional (FIGUEIREDO et al., 2007).

No Brasil, em 1982, ocorreu a primeira epidemia de DENV-1 e DENV-4, em Boa Vista (Roraima) e, em 1986, o DENV-1 disseminou-se pelo país. No início de 1990, ocorreu a primeira epidemia de DENV-2 no Estado do Rio de Janeiro. Embora a epidemia tenha sido predominantemente de dengue clássico, 462 casos de dengue hemorrágico (DH) foram notificados totalizando oito óbitos. Em 2000, o DENV-3 foi introduzido no Rio de Janeiro, disseminando-se rapidamente para outros Estados e, nos últimos três anos, tem sido o sorotipo responsável pela maioria dos casos de dengue e de DH no Brasil (VASCONCELOS, 2005). E, em estudos recentes, o DENV-4 foi detectado em Manaus (FIGUEIREDO, 2008).

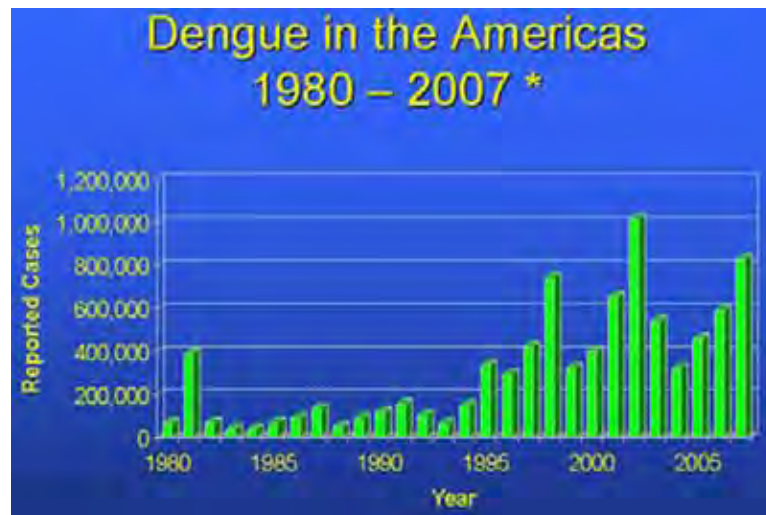
Segundo a World Health Organization (2008), a prevalência mundial de dengue cresceu dramaticamente nas últimas décadas. A doença tornou-se endêmica em 112 países da África, das Américas, da Região Leste do Mediterrâneo, do Sudeste Asiático e do Pacífico Ocidental. Calcula-se que 40% da população mundial, cerca de 2,5 bilhões de pessoas vivendo em áreas tropicais e subtropicais, estão em risco (Figura 3).



**Figura 3:** Mapa da distribuição mundial do vírus e do seu vetor, *Aedes aegypti* em 2008 (CDC, 2008).

Todos os anos, cerca de 50 a 100 milhões de casos de dengue, 500.000 casos DH e no mínimo 12.000 mortes são relatados no mundo (WHO, 2008). Mais de 160.000 casos de dengue e de dengue hemorrágico foram descritos na região do Pacífico Ocidental. Em 2005, houve cerca de 320.000 casos de dengue nas Américas dos quais, 15.253 eram de DH, com 80 mortes registradas (Gráfico 1). Somente no Brasil aconteceram cerca de 2/3 dos casos e metade dos óbitos. Estes dados são maiores que os do ano de 2004: 267.050 casos de dengue clássico, 9.810 casos de DH e 71 óbitos (SINGHI et al., 2007).

**Gráfico 1:** Evolução do número de casos de dengue nas Américas de 1980 a 2007 (CDC, 2008).



### 1.2.1.2. Vírus da Febre Amarela (YFV):

O vírus da Febre Amarela pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, com genoma constituído de RNA de fita simples não segmentado, polaridade positiva, com cerca de 11 kilobases de comprimento. Esse genoma possui uma única região codificante (ORF) com cerca de 10.233 nucleotídeos que vão codificar a formação das inúmeras proteínas virais e que é flanqueada por duas regiões não codificantes (NCR) de tamanho variável, sendo uma grande a 3'NCR com cerca de 511 nucleotídeos e uma pequena 5'NCR que possui 118 nucleotídeos. As regiões não codificantes, são importantes para a regulação e expressão do vírus (ZANOTTO et al., 1996).

A transmissão ocorre por picada da fêmea hematófaga que se infecta picando indivíduos virêmicos. O vírus multiplica-se no aparelho digestivo e sua chegada às glândulas

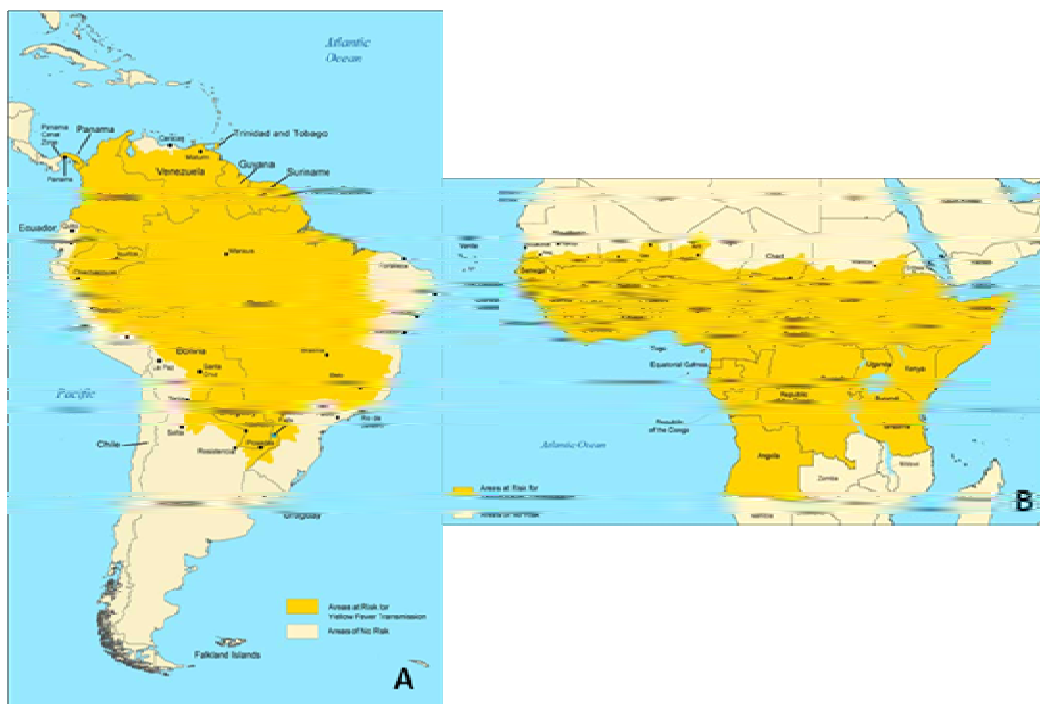


salivares determina o início da transmissão viral pelo mosquito que passa a transmití-lo por toda a vida. Outra forma importante de transmissão entre os mosquitos é a transovariana, passando assim o vírus diretamente para a prole, dispensando o homem no ciclo mantenedor (FIGUEIREDO et al., 2005). Tem comportamento endêmico no Continente Africano e na América Latina (Figura 4). Bolívia, Equador, Peru, Colômbia e Brasil são os principais países endêmicos nas Américas. No Brasil, é mantido em ciclo silvestre caracterizado por epizootias entre as espécies de primatas não-humanos, considerados os principais hospedeiros vertebrados. O mosquito *Haemagogus janthinomys* é o principal transmissor e mosquitos do gênero *Sabethes* são considerados vetores secundários. No ciclo urbano, o vírus é transmitido diretamente ao homem pela picada do mosquito *Aedes aegypti* (VASCONCELOS, 2005).

O vírus é mais facilmente isolado do soro durante os primeiros quatro dias da doença, existindo relatos de isolamento viral do soro após períodos tardios como, por exemplo, 14 dias. As técnicas de isolamento viral mais usadas a partir de material clínico são as técnicas de inoculação intracerebral em camundongos ou em culturas de células de mosquito. O diagnóstico pode ser feito com rapidez e sensibilidade pela detecção do genoma viral pela RT-PCR, possuindo, ainda como vantagem, a possibilidade de sequenciar nucleotídeos do fragmento de genoma viral produzido, permitindo análise sobre a ocorrência de mutações e características filogenéticas do vírus. Antígenos virais ou complexos vírus-IgM podem ser detectados por teste imunoenzimático. O diagnóstico específico depende do isolamento viral, demonstração de antígenos ou do genoma viral e da resposta humoral desenvolvida contra este vírus pelos pacientes infectados; porém possa ser que haja a necessidade de estudos anatomopatológicos de órgãos como o fígado (FIGUEIREDO et al., 2005).

A Febre Amarela é enzoótica nas regiões da Amazônia e Centro-Oeste, e no Estado do Maranhão onde todos os anos se registram casos da virose; periodicamente o vírus incursiona em direção sul, ocasionando epidemias na parte ocidental da Bahia, e epizootias foram registradas no Rio Grande do Sul, inclusive com isolamento do vírus em *Haemagogus leucocelaenus*, além de grande epidemia em Minas Gerais com casos sendo diagnosticados inclusive em áreas do estado considerada livre de arboviroses (VASCONCELOS et al., 2006). A infecção pode ser assintomática, causar doença febril aguda branda ou moderada e casos graves de febre hemorrágica cursando com falência hepática, insuficiência renal e morte (FONSECA, 1996).

De acordo com a Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN (2008) a única forma de prevenção eficaz é a vacinação. Apesar da extensiva campanha de vacinação, desde os anos 80 tem se verificado a re-emergência da Febre Amarela Silvestre no Brasil. Anualmente são notificados vários casos silvestres da doença, principalmente nas Regiões Amazônica, do Planalto Central e do Pantanal brasileiro, onde foram registrados, nos anos de 2003 a 2006, 71 casos, com letalidade de 60% entre 2003 e 2004 e 100% nos anos seguintes. Entre dezembro de 2007 a janeiro de 2008, foram registrados 20 casos de Febre Amarela silvestre nas regiões dos Estados de Goiás, Distrito Federal e Mato Grosso, com letalidade de 50% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).



**Figura 4:** Zonas endêmicas de Febre Amarela. Em A: na América. Em B: na África (CDC, 2009).

### 1.2.1.3. Vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV):

O vírus Saint Louis é membro da família *Flaviviridae*, um grupo de vírus RNA, pequenos (40 a 60 nm), envelopados, dextrógiros, de banda única que se replicam no citoplasma das células infectadas (TRENT et al., 1980).

A encefalite viral de Saint Louis é uma doença infecciosa febril aguda causada pelo SLEV e transmitida por mosquito (pernilongo comum, *Culex*) caracterizada por inflamação e lesão de meninges e parênquima cerebral. A doença ocorre de forma endêmica e epidêmica, principalmente na América do Norte (Figura 5) (SBI, 2006).

O primeiro isolamento do SLEV ocorreu durante um surto, em 1933, nas cidades de Saint Louis e Kansas (EUA) e desde então relatos de outros casos e surtos têm ocorrido na América do Norte. No Brasil, apenas três casos de SLEV em humanos haviam sido relatados na década de 1970, dois na região norte e um terceiro identificado no município de São Pedro/SP no ano de 2004 (ROCCO et al., 2005; REINA et al., 2006). Em 2006, concomitante a uma epidemia de DENV-3, ocorreu o primeiro surto de SLEV no município de São José do Rio Preto/SP, com registro de 12 casos e um de co-infecção com DENV-3 (MONDINI et al., 2007a; MONDINI et al., 2007b).



**Figura 5:** Distribuição de SLEV em humanos de 1964 a 2006 nos Estados Unidos (CDC, 2007).

A maior parte dos casos de SLEV relatados passa despercebida por ser assintomático, subclínico ou com sintoma semelhante a um resfriado comum. Os principais sinais e sintomas observados incluem febre, cefaléia, mialgia, náuseas/vômitos e sonolência. Normalmente, quadro grave com sinais neurológicos focais e encefalite ocorre em pacientes com mais de 60 anos ou imunodeprimidos, para os quais a letalidade varia de 7 a 24% (REINA, 2006).

Além disso, o fato de SLEV ter sido identificado como a causa de doença humana indica a necessidade de aprimorar a vigilância a fim de detectar precocemente esse agente no Estado de São Paulo e no Brasil, trata-se, também, de um alerta para os profissionais de saúde sobre a necessidade de investigações clínicas e epidemiológicas mais completas sobre doenças febris, pois infecções por SLEV podem não ser reconhecidas ou confundidas com outras doenças causadas por arbovírus como dengue (ROCCO et al., 2005).

#### **1.2.1.4. Vírus West Nile (WNV):**

Esse vírus é membro da família *Flaviviridae* do gênero *Flavivirus*, é um vírus RNA, composto de 11.029 nucleotídeos, envoltos em um capsídeo interno de 35 nm. Ele é constituído de múltiplas cópias de uma proteína central e circundado por uma camada externa contendo proteínas estruturais do envelope e de membrana. A proteína E parece estar implicada na ligação do vírus às células, sendo o principal alvo para os anticorpos neutralizantes. Além das proteínas estruturais, o genoma viral codifica sete proteínas não estruturais envolvidas na replicação e maturação do vírus (SOLOMON et al., 2003). Foi primeiramente isolado em 1937 no sangue de uma mulher na região nordeste de Uganda, às margens ocidentais do Rio Nilo, tendo assim recebido o nome de "West Nile Virus", ou vírus do Nilo Ocidental (HOWARD-RUBEN, 2003).

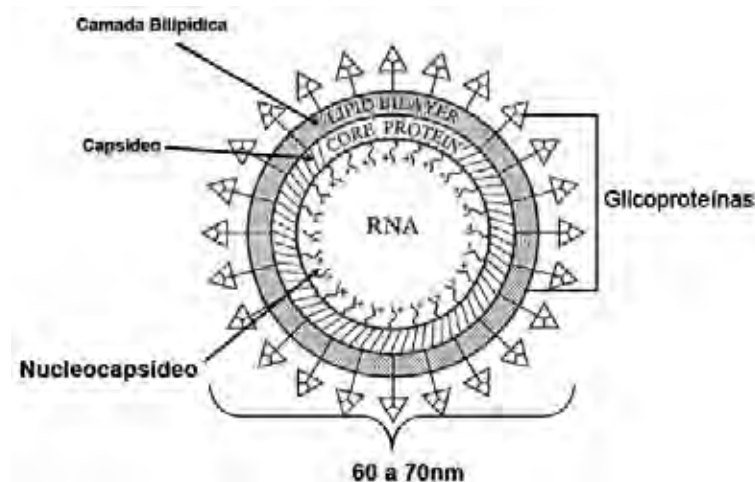
A encefalite de West Nile é uma das principais doenças emergentes nas Américas. Em Nova York, no ano de 1999, o WNV foi isolado de humanos e equinos com encefalite e, desde então, difundido em direção ao México e Caribe (KOTAIT, 2006; GOULD & SOLOMON, 2008; KRAMER et al., 2008). De 2005 a 2007, anticorpos contra WNV foram detectados em equinos na Colômbia, Buenos Aires e em equinos e aves na Venezuela (KOTAIT, 2006; BOSCH et al., 2007). No Brasil, desde 2002 têm sido realizados esforços no sentido de se estabelecer a vigilância epidemiológica ativa de aves migratórias, porém ainda não houve identificação de vírus ou de anticorpos, apesar da grande diversidade de aves migratórias existentes em algumas regiões (KOTAIT et al., 2006).

Epidemias por WNV estão associadas a doenças em equinos e aves migratórias que se acredita serem hospedeiros amplificadores juntamente com mosquitos do gênero *Culex*. Em humanos, a transmissão pode ocorrer através de transplantes de órgãos, transfusões de sangue

e do leite materno (GOULD & SOLOMON, 2008). É descrito que entre 70% e 80% das pessoas infectadas são assintomáticas. Aproximadamente 20% a 30% desenvolvem um quadro febril e, entre um a cada 150 e um a cada 200 indivíduos apresentam envolvimento do sistema nervoso central. A encefalite fatal relacionada ao WNV é estimada em uma a cada mil infecções. O risco de doença grave é maior em pacientes com idade superior a 50 anos e em indivíduos imunocomprometidos (CDC, 2002).

### 1.2.2. *Alphavirus:*

O genoma consiste de RNA de fita simples, não segmentado e de polaridade positiva (Figura 6). Este RNA codifica proteínas estruturais e não estruturais. Os alphavirus são altamente patogênicos para humanos e animais domésticos. Esses vírus zoonóticos são transmitidos por insetos hematófagos, e mantidos em ciclos de transmissão enzoóticos por várias espécies de mosquitos e vertebrados silvestres, especialmente roedores e pássaros, como hospedeiros primários. As infecções por alphavírus em humanos produzem sintomatologia clínica não-específica, cujos quadros são similares àqueles causados por outros arbovírus como Oropouche e Dengue, ou quadros de encefalite de gravidade (CASTRO et al , 2005).



**Figura 6:** Esquema de um Alphavirus, onde estão representadas as glicoproteínas, o capsídeo e a camada bilipídica formando o envelope. Os virions medem aproximadamente de 60 a 70 nm (BATISTA, 2007).

### 1.2.2.1. Vírus das Encefalites Equinas do Leste, Oeste e Venezuelana:

Os agentes causais das encefalites equinas são RNA-vírus, de cadeia simples, não segmentados, de sentido positivo, esféricos, com 60-70 nm de diâmetro, apresentando envelope com projeções (espículas de glicoproteína). Possuem cinco proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K e E1), sendo a E1 a mais conservada e a E2, aquela que apresenta maior polimorfismo intra e interespecífico. São pertencentes a família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus* e três espécies virais são causadoras de encefalites: Eastern equine encephalitis virus (EEEV), Western equine encephalitis virus (WEEV) e Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV). As doenças causadas – denominadas encefalite equina do leste (EEL), encefalite equina do oeste (EEO) e encefalite equina venezuelana (EEV) – receberam esta denominação de acordo com a localização de sua primeira identificação (VAN REGENMORTEL et al. 2000).

As encefalites equinas causam epizootias em equinos domésticos e surtos de doença febril aguda ou meningoencefalites em seres humanos (VASCONCELOS, 1998).

O EEEV está amplamente distribuído nas Américas. No Brasil, já foi isolado em equinos localizados no Amazonas, Pará, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul (Figura 7). Sua transmissão se apresenta com um ciclo básico silvestre (entre aves silvestres), envolvendo a participação de mosquitos do gênero *Culex* e um segundo ciclo em pássaros locais, do qual participam mosquitos do gênero *Aedes*. O homem e o equino são hospedeiros acidentais e não contribuem para a manutenção dos vírus (KOTAIT, et al. 2006).



**Figura 7.** Distribuição da encefalite equina do leste no Brasil (GRIFFIN, 2001; KOTAIT et al. 2006).

O WEEV foi isolado em 1938, na região oeste dos Estados Unidos. Há identificação de diversos subtipos, porém, só o subtipo clássico possui importância epidemiológica, com distribuição no Canadá, EUA, México, Haiti, Guiana, Argentina, Uruguai e Brasil (Figura 8). A sintomatologia em equinos e em humanos é semelhante àquela determinada pela infecção com o EEEV (KOTAIT, et al. 2006).

No Brasil foi isolado em vetores na Floresta da Tijuca, no Rio de Janeiro, e já foram encontrados anticorpos em equinos e humanos (IVERSSON et al., 1982; BRUNO-LOBO et al., 1961). Alguns isolamentos foram realizados em aves silvestres, as quais parecem desempenhar papel importante no ciclo de manutenção deste vírus, apresentando viremia com títulos altos, suficientes para infectar vetores, principalmente do gênero *Culex*. Humanos e equinos são hospedeiros acidentais e apresentam viremia com títulos baixos (FIGUEIREDO, 1994; KOTAIT et al., 2006).



**Figura 8.** Distribuição da encefalite equina do oeste nas Américas (GRIFFIN, 2001; KOTAIT et al. 2006).

O VEEV é uma reemergência com um caráter “explosivo”, envolvendo geralmente muitos humanos. São classificados seis subtipos (de I a VI), sendo que algumas variantes são chamadas de epizoóticas e outras de enzoóticas (WEAVER et al., 2004).

Os equinos, nesta enfermidade, são amplificadores dos vírus e há, ainda, relatos de isolamento dos subtipos em cerca de 30 outras espécies de mamíferos, podendo ser destacados isolamentos realizados em morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) e em

morcegos frugívoros *Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata* e *Uroderma bilobatum*. Os morcegos podem atuar como hospedeiros alternativos para manutenção da circulação viral, especialmente quando muitas espécies de mamíferos silvestres terrestres adquirem imunidade (SANMARTIN et al., 1967; SEYMOUR et al., 1978; CALISHER et al., 1982).

No Brasil, roedores silvestres são os principais hospedeiros deste vírus, além de morcegos, aves silvestres e marsupiais atuarem como hospedeiros secundários. Mosquitos do gênero *Culex* podem estar envolvidos na transmissão do vírus ao homem. Nenhum caso humano de encefalite, causada por estes vírus, foi registrado no país, tendo sido observados apenas casos de doença febril aguda, apesar da prevalência de anticorpos entre moradores da Região do Vale do Ribeira/SP (IVERSSON, 1990; VASCONCELOS et al., 1991).

#### **1.2.2.2. Vírus Mayaro (MAYV):**

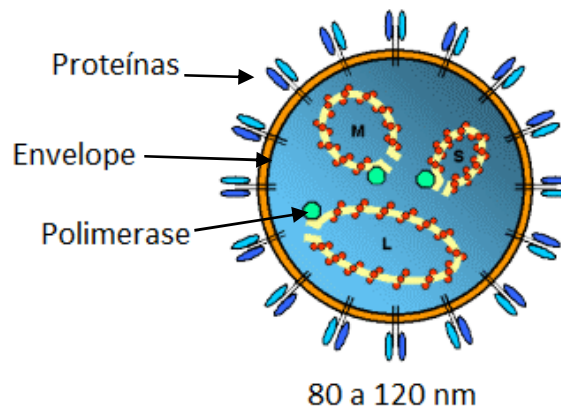
Vírus pertencente à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*, e de ocorrência no Brasil, nas regiões Amazônica e Central, onde o principal vetor, *Haemagogus janthinomys*, é encontrado em abundância. Os primatas não-humanos, bem como aves silvestres, atuam, respectivamente, como hospedeiro primário e secundário, desempenhando papel fundamental na manutenção e disseminação do vírus (VASCONCELOS, 1998). Existe a possibilidade do MAYV vir a causar grandes epidemias urbanas, pois acredita-se que possa ser transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti*, amplamente disseminado nas cidades brasileiras (TRAVASSOS-DA-ROSA et al., 1997).

No Estado do Pará, quatro epidemias foram notificadas: em uma comunidade próxima do Rio Guamá, em 1955; em Belterra no ano de 1978; em Conceição do Araguaia em 1981; e em Benevides, 1991 (CAUSEY et al., 1957; PINHEIRO et al., 1981; VASCONCELOS et al., 1998). Dois outros surtos foram registrados em Itarumã, Goiás, em 1987 e em Peixe, Tocantins, em 1991 (VASCONCELOS et al., 1998). Anticorpos específicos contra MAYV também foram encontrados em índios Xavantes do Mato Grosso e em habitantes das áreas rurais de Goiás (NEEL et al., 1968 ; PINHEIRO et al., 1986). No Estado de São Paulo, MAYV foi detectado em três pacientes que se infectaram, no ano de 2000, durante uma pescaria no município de Camapuã, Mato Grosso do Sul (COIMBRA et al., 2007).



### 1.2.3. *Orthobunyavirus*:

Os *Bunyaviridae* são vírus de RNA, esféricos e envelopados, medindo de 80 a 120 nm, que possuem projeções glicoprotéicas na superfície. Têm na composição química 2% de RNA, 58% de proteínas, 33% de lipídios, e 7% de carboidratos. Possuem RNA de fita, simples e trissegmentado (Figura 9). Dois segmentos têm polaridade negativa e são denominados grande (L), com 6.875 nucleotídios e médio (M), com quatro mil, quatrocentos e cinquenta e oito nucleotídios. O terceiro segmento, denominado pequeno (S), com novecentos e sessenta e um nucleotídios pode ser *ambisense* em alguns membros da família (MERTZ, 1997).



**Figura 9:** Desenho mostrando a morfologia do vírus da família *Bunyaviridae*. Possuem três segmentos helicoidais no nucleocapsídeo (L, M e S). Possuem no envelope uma camada bilipídica. Têm dimensões que variam entre 80 a 120 nm de diâmetro (BATISTA, 2007).

A família *Bunyaviridae* inclui mais de 300 vírus distintos, compreendidos em 4 gêneros: *Bunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus* e *Phlebovirus*. Cada gênero da família *Bunyaviridae* inclui múltiplos sorotipos. A grande maioria destes vírus são arbovírus transmitidos por mosquitos, flebótomos ou carrapatos, e mantidos na natureza como zoonoses. No Brasil, foram isolados dezenas de vírus desta família, sendo o mais importante deles do ponto de vista epidemiológico, o vírus Oropouche, por causar epidemias extensas na Região Amazônica (FIGUEIREDO, 1999).

### 1.2.3.1. Vírus Oropouche (OROV):

Arbovírus pertencente à família *Bunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus* (FAUQUET et al., 2005). A partícula viral apresenta-se sob a forma esférica, cujo diâmetro varia de 90 a 100 nm. Por apresentar envelope, o vírus é sensível à ação de solventes orgânicos (éter e clorofórmio) e detergentes (desoxicolado de sódio) (KARABATSOS, 1985). A simetria dos virions é helicoidal apresentando como material genético o RNA (BISHOP & SHOPE, 1979).

O vírus é mantido na natureza pelos ciclos silvestre e urbano. No ciclo silvestre, preguiças, macacos e aves são os hospedeiros vertebrados e o *Aedes serratus*, *Culex quinquefasciatus* e *Culicoides paraensis* (maruim) vetores. No ciclo urbano, o vírus é transmitido de pessoa a pessoa através da picada do *Culicoides paraensis*, amplamente disseminado em áreas tropicais e subtropicais das Américas (PINHEIRO, 1997; VASCONCELOS et al., 1992).

No Brasil, o vírus foi isolado pela primeira vez em 1960, a partir do sangue de uma preguiça (*Bradypus trydactylus*) capturada em uma área silvestre durante a construção da rodovia Belém-Brasília e de um lote de mosquitos *Ochlerotatus serratus* capturados próximo à mesma área. No ano seguinte, a doença foi detectada na capital Paraense, ocasião em que o vírus causou uma grande epidemia, na qual cerca de 11.000 pessoas foram afetadas pela doença (PINHEIRO et al., 1962).

A partir deste momento, o OROV demonstrou seu potencial epidêmico causando outras epidemias em diferentes centros urbanos da região Norte e Nordeste do Brasil, mais especificamente nos estados do Pará, Amapá, Amazonas, Acre, Tocantins, Maranhão e Rondônia (PINHEIRO et al., 2004). Dois surtos de Oropouche ocorreram na região Norte do Brasil durante os anos de 2003 e 2004. O primeiro aconteceu em Abril/Maio de 2003, em duas comunidades, Vila Sanão e Vila Paulo Fontelles, no município de Parauapebas/PA. E o segundo, entre Julho/Agosto, em uma comunidade, Vila Tapara, no município de Porto de Moz/PA (AZEVEDO et al., 2007). E em um estudo realizado por Terzian e colaboradores (2009), demonstrou a presença do OROV na cidade de Acrelândia/AC. A dispersão da virose provavelmente é resultado da movimentação de pessoas em fase virêmica pelas localidades onde existe o vetor transmissor (PINHEIRO et al., 2004).

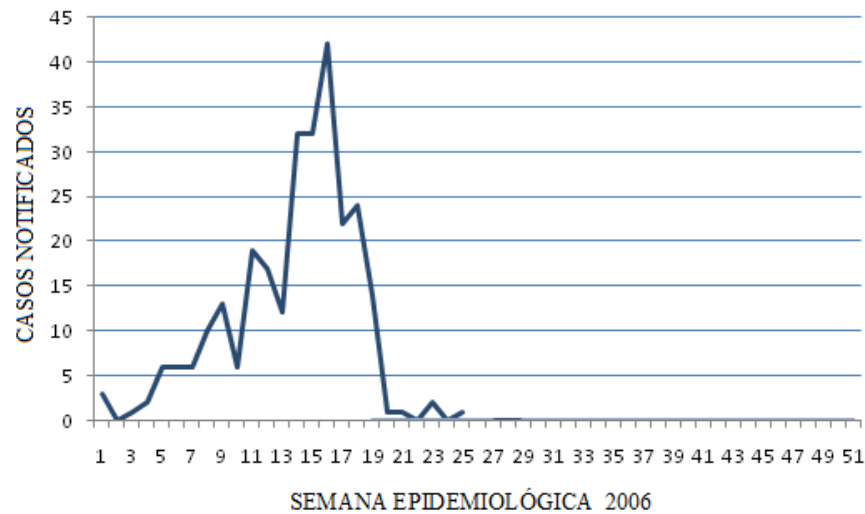
### 1.3. Histórico de Epidemia de Dengue na Cidade de Tupã:

O município de Tupã fica localizado em uma região chamada de Alta Paulista, no Oeste do Estado de São Paulo (Figura 10). Fundada em 1929, recebeu o nome em homenagem ao Deus do Trovão indígena. Distante 530 km da capital paulista, 151 km de Araçatuba, 115 km de Presidente Prudente e 328 km de Ribeirão Preto. Sua área é de 629,11 km<sup>2</sup> com cerca de 63 mil habitantes. Rica em recursos hidrográficos e contando com o distrito de Varpa, foi declarado, em 2002, como Estância Turística pelo Governo Estadual. Seu território é predominantemente arenoso (arenito de Bauru), com a hidrografia formada pelos rios do Rio do Peixe e Feio, além dos ribeirões Iacri, Sete de setembro, Pitangueiras e Afonso XIII. A temperatura média varia entre 37°C nas máximas e 7°C nas mínimas. As precipitações pluviométricas ocorrem, com maior frequência, nos meses de fevereiro e outubro, em médias estimadas em 1.200 mm por ano (IBGE, 2001).



**Figura 10:** Localização da cidade de Tupã no Estado de São Paulo (UNIVERSIA, 2004).

A primeira epidemia de Dengue em Tupã ocorreu no ano de 1995, com circulação do DENV-1, 195 casos, e Índice Breteau (IB), que mede a infestação do mosquito *Aedes aegypti*, de 18 pontos. Já 2002, outra epidemia com 159 casos e circulação do DENV-2 e, em 2006, voltou a enfrentar uma nova epidemia com a introdução do DENV-3, com 272 casos confirmados (Gráfico 2), sendo um deles dengue clássico com manifestação hemorrágica (CVE, 2006).

**Gráfico 2.** Casos Notificados de Dengue por Semana Epidemiológica, Tupã, 2006

De acordo com a Secretaria Estadual da Saúde – SES/SP (2009) é considerado estado de epidemia quando existem mais de 300 casos por 100 mil habitantes. Em Tupã o parâmetro foi classificado como Hiperendêmico ( $\geq 20,0/10.000$  hab.) e o Coeficiente de Incidência de Dengue foi de 431,74 (número de casos de dengue residentes/população da área de abrangência X 100.000).

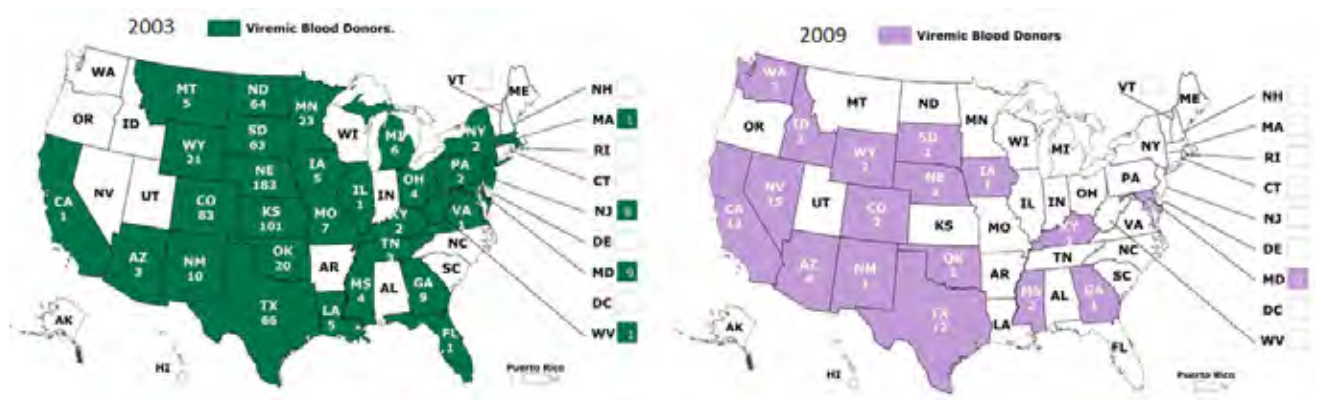
#### 1.4. Arboviroses e Transfusão Sanguinea:

Os arbovírus apresentam uma ampla distribuição geográfica, com predomínio nas regiões tropicais, por oferecerem condições ecológicas favoráveis (FIGUEIREDO, 2000). Constituem um sério problema de saúde pública devido à expressiva morbidade e/ou mortalidade que ocasionam. A prevalência mundial de arboviroses cresceu dramaticamente nas últimas décadas, e nas áreas onde estas doenças são endêmicas, a transmissão por transfusão dificilmente é investigada (MOHAMMED, et al., 2008).

A preocupação com a transmissão de arbovirus aumentou após a documentação da transmissão de West Nile Vírus (WNV) por transfusão nos EUA (PEALER et al., 2003). Nos EUA, o primeiro caso de suspeita de infecção pelo WNV pela transfusão de hemocomponentes foi relatado em 30 de agosto de 2002 em uma paciente que havia sido transfundida durante procedimento obstétrico (HARRINGTON et al., 2003). Entre 28 de agosto 2002 e 1º de março de 2003, o Centro de controle de doenças nos Estados Unidos

documentou 61 casos de possível transmissão de WNV pela transfusão de sangue e hemocomponentes, sendo confirmados 23 casos baseados em dados epidemiológicos e laboratoriais; 19 foram classificados como inconclusivos e em outros 19 a infecção pelo WNV foi descartada (PEALER et al., 2003). Um total de 714 casos prováveis de WNV em doadores de sangue foram detectados (Figura 11); cerca de 1% deles apresentaram doença neuroinvasiva e 16% quadro febril associado ao WNV (CDC, 2003).

Trabalhos recentes demonstraram a transmissão de dengue por transfusão sanguínea, em amostras de doadores de sangue. De acordo com Mohammed et al. (2008) aproximadamente 1 em 1000 doações contém o vírus dengue, em um estudo realizado em Porto Rico. Tal transmissão também foi evidenciada por Linnen e colaboradores (2008) e documentada em receptores de Hong Kong (CHUANG et al., 2008). Porém, apesar disto, a frequência dessas ocorrências nos países endêmicos ainda é desconhecida.



**Figura 11:** Casos de WNV em doadores de sangue nos EUA. Em verde: em 2003 foram registrados 714 casos. Em roxo: em 2009 foram registrados 62 casos (CDC, 2003; CDC, 2009).

## ***RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA***

---

## 2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Apesar da Legislação Brasileira que rege a matéria sangue, como por exemplo, a Resolução RDC nº 153, de 14 de junho de 2004, que determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos (ANVISA, 2004), e do progresso em se identificar infecções como HBV, HCV, HIV, HTLV em testes sorológicos para a seleção dos doadores, pouco se tem feito em relação aos arboviroses, que podem passar despercebidas por causarem infecções assintomáticas e de alta incidência, especialmente durante os surtos, sugerindo que um número substancial de doadores possa ser virêmico no momento da doação (MOHAMMED, et al., 2008).

O vírus Dengue e o vírus West Nile são semelhantes em alguns aspectos, o que suporta a hipótese de que DENV possa ser transmitido por transfusão sanguínea: 1) são flavivírus eficientemente transmitidos ao homem através da picada de mosquitos infectados, 2) grande proporção (53%-87%) das infecções são assintomáticas, 3) níveis de viremia durante a fase de incubação pode exceder  $10^6$  virions por mL (ROTHMAN, 2004) e 4) transmissão de ambos foi documentada após transplante de órgão e em acidentes com profissionais da saúde (CHEN & WILSON, 2005; LINNEN et al., 2008).

Diante da grande importância que essas doenças representam para a saúde pública no Brasil, a detecção de uma determinada patologia transmitida pelo sangue, antes da transfusão, contribuirá para adoção de medidas terapêuticas precoces propiciando dessa maneira a minimização do risco de co-morbidade. Além disso, respaldaria o Estado e os serviços de hemoterapia quanto à sua isenção como órgão responsável pela infecção imputada à transfusão, em casos de demanda judicial. (CARRAZZONE et al., 2004).

***OBJETIVO***

---



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral:

Investigar a presença de Arbovírus em amostras clínicas de doadores de sangue da Região Amazônica e em amostras obtidas durante uma epidemia de Dengue, em 2006, na cidade de Tupã/SP.

#### 3.2. Objetivos Específicos:

- Realizar *Duplex-RT-PCR* e *Multiplex-Nested-PCR* para diagnóstico molecular de *Flavivirus* e *Alphavirus*;
- Fazer o diagnóstico molecular de *Orthobunyavirus* através da técnica de *RT-Nested-PCR*;
- Utilizar *RT-PCR* e *Multiplex-Nested-PCR* para diagnóstico molecular de *Flavivirus* das amostras de Tupã.

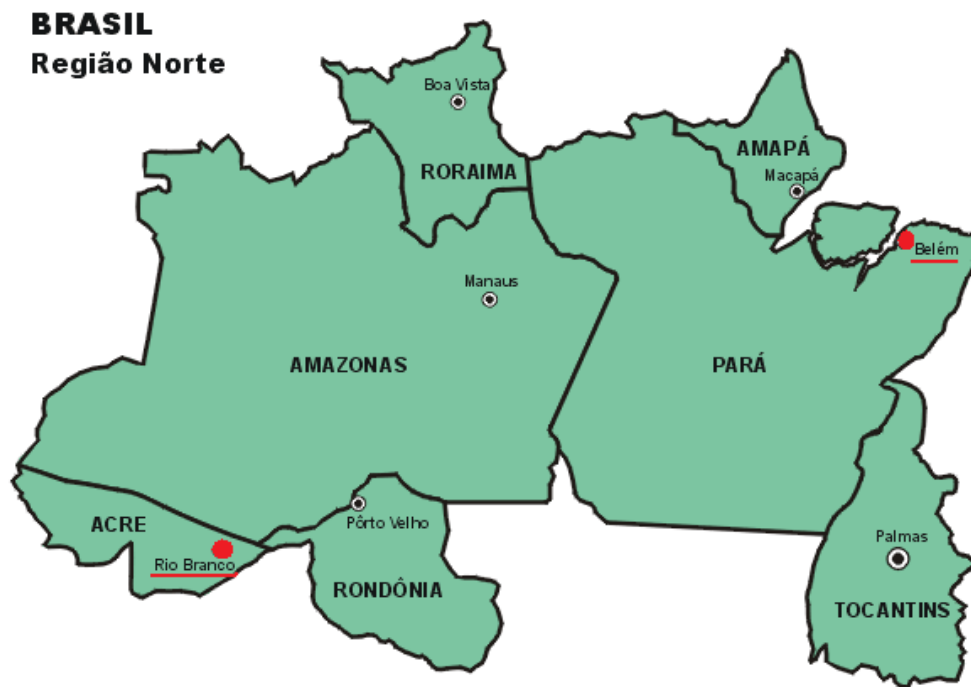
## ***MATERIAL E MÉTODOS***

---

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Amostras Clínicas:

Duzentas e cinco amostras clínicas de doadores foram obtidas nos Bancos de Sangue das cidades de Rio Branco/AC (50 amostras), Belém/PA (50 amostras) e Tupã/SP (105 amostras) e foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  no Laboratório de Pesquisas em Virologia da FAMERP. Plasmas de doadores de Rio Branco e Belém (Figura 12), coletados em 2003, foram cedidos pelo Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado, da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, e os provenientes da cidade de Tupã foram cedidos pela Prof. Dra. Márcia Aparecida Speranca, da Faculdade de Medicina de Marília – FAMEMA, tendo sido coletados durante uma epidemia de Dengue no ano de 2006. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.



**Figura 12:** Mapa mostrando a localização das cidades de Rio Branco/AC e Belém/PA em relação à Região Norte do Brasil (IBGE, 2007).

#### 4.2. Estratégia de Estudo:

As amostras foram analisadas para a detecção e classificação do agente viral em *Alphavirus* e/ou *Flavivirus* segundo estratégia desenvolvida por Bronzoni et al. (2005), na qual se utiliza o método de RT-PCR em duas etapas. Na primeira delas, *primers* gênero-específicos são usados simultaneamente, em um sistema de *Duplex-RT-PCR*. Já na segunda etapa, *primers* espécie-específicos são usados, simultaneamente, em um sistema de *Nested-PCR* para a identificação da espécie viral (Tabela 1). Desta forma, foram realizadas três *Multiplex-Nested-PCR* (M-N-PCR): para a identificação de VEEV, EEEV, WEEV, AURAV e MAYV; DENV-1, DENV-2, DENV-3, SLV e YFV; e DENV-4, ROCV, ILHV, WNV. Já para a detecção e identificação do vírus Oropouche, seguiu-se a metodologia de RT-N-PCR desenvolvida por Moreli et al. (2002).

**Tabela 1:** Relação dos arbovírus brasileiros pesquisados

FAMÍLIA	GÊNERO	VÍRUS (ABREVIACÃO)
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	Encefalite Equina Venezuelana (VEEV) Encefalite Equina do Leste (EEEV) Encefalite Equina do Oeste (WEEV) Aura (AURAV) Mayaro (MAYV)
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	Dengue (DENV-1,2,3,4) St. Louis Encephalitis (SLEV) Ilhéus (ILHV) Rocio (ROCV) Febre Amarela (YFV) West Nile (WNV)
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Orthobunyavirus</i>	Oropouche (OROV)

#### 4.3. Extração de RNA:

O RNA viral foi extraído a partir de 140 µl das amostras clínicas, utilizando o *Qiamp Viral RNA Kit* (QIAGEN Inc, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. O volume final obtido foi de 60 µl.

#### 4.4. Primers:

*Primers* utilizados na detecção dos *Flavivirus* se ligam a regiões do gene da proteína NS5, já os de *Alphavirus* se ligam a regiões do gene da proteína nsP1, e os *Orthobunyavirus* se ligam no segmento S do sorogrupo Simbu (Tabela 2).

**Tabela 2.** *Primers* utilizados no estudo

<i>Primers</i>	Seqüência (5'-3')	<i>Amplicon</i> (pb)	Referência
<b><i>Primers</i> gênero-específicos para <i>Alphavirus</i> e <i>Flavivirus</i></b>			
M2W (+)	YAGAGCDTTTTCGCAYSTRGCHW	434	Pfeffer et al.,1997
CM3W (-)	ACATRAANKGNGTNGTRTCRAANCCDAYCC		
FG1 (+)	TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT	1000	Fulop et al.,1993
FG2 (-)	GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATACA		
<b><i>Primers</i> espécie-específicos para <i>Alphavirus</i></b>			
NVEE (+)	ACGGAGGTAGACCCATCCGA	400 <sup>1</sup>	Bronzoni et al., 2004
NEEE (+)	CCACGGTACCGTTGCC	124 <sup>1</sup>	
NWEE (+)	GGCGGCAGACCTGCTGGAA	208 <sup>1</sup>	
NAURA (+)	TCAATGCACCTTCGACCA	86 <sup>1</sup>	
NMAY (+)	GGAAGTTGGCCAAGGC	270 <sup>1</sup>	
<b><i>Primers</i> espécie-específicos para <i>Flavivirus</i></b>			
NDEN1 (-)	CGTTTTGCTCTTGTGTGCGC	472 <sup>2</sup>	Bronzoni et al.,2005
NDEN2 (-)	GAACCAGTTTGGTTDRTTTCATCGCTGCC	316 <sup>2</sup>	
NDEN3 (-)	TTCCTCGTCCTCAACAGCAGCTCTCGCACT	659 <sup>2</sup>	
NDEN4 (-)	GCAATCGCTGAAGCCTTCTCCC	222 <sup>2</sup>	
NSLE (-)	ATT CTT CTC TCA ATC TCC GT	232 <sup>2</sup>	
NILH (-)	TCC ACC GCT GAT CTG AGC CCG TGA	474 <sup>2</sup>	
NROC (-)	TCA CTC TTC AGC CTT TCG	230 <sup>2</sup>	
NYF-253(-)	TCAGAAGACCAAGAGGTCATGT	253 <sup>2</sup>	
NWN (-)	TCC CCC CGC AGG TGT GCC TCG	717	
<b><i>Primers</i> específicos para <i>Oropouche</i></b>			
BUN-S	AGT AGT GTG CTC CAC	300pb	Moreli et al.,2002
BUN-C	AGT AGT ATA CTC CAC		
BS-C	TGA ACC CTA TGC ATC T		
BS-S	GTG GGG TCC AAT TTG C		

<sup>1</sup>Com o *primer* cM3W. <sup>2</sup>Com o *primer* FG1. (+): sentido genômico; pb: pares de bases.

#### 4.4.1. Duplex-RT-PCR para detecção de *Alphavirus* e *Flavivirus*:

A RT foi realizada pela adição de 8 µl de RNA em uma mistura contendo 4 µl de solução tampão cinco vezes concentrada (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 1,4 µl de DTT (*Dithiothreitol*) a 0,1 M, 1,6 µl da mistura contendo 250 µM de cada dNTP (*DeoxynucleosideTriphosphate*), 1µl de cada *primer* cM3W (a 100 µM) e FG2 (a 15 µM), 20 U do inibidor de ribonuclease (RNaseOUT-Invitrogen, USA), 200 U de enzima transcriptase reversa (*Superscript II*-Invitrogen, USA) e água suficiente para completar 20 µl. A mistura foi incubada a 42°C por 50 min e a 70°C por 15 minutos.

A mistura de PCR consistiu de 8 µl do produto da RT, 5 µl da solução tampão 10 vezes concentrada (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 2 µl de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM, 4µl da mistura contendo 250 µM de cada dNTP, 1µl de cada *primer* M2W (a 50 µM) e FG1 (a 15 µM), 1U da enzima polimerase (*Taq DNA polymerase recombinant*-Invitrogen, USA) e água suficiente para completar 50 µl. A mistura foi submetida a 30 ciclos de 94°C por 1 min, 53°C por 1 min e 72°C por 2 min, finalizando com um ciclo de 72°C por 5 min. As reações de RT-PCR foram realizadas em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystem, USA).

#### 4.4.2. Multiplex-Nested-PCR para identificação de *Alphavirus*:

A mistura de M-N-PCR consistiu de 1 µl do produto obtido na D-RT-PCR, 1 U da enzima polimerase, 5 µl da solução tampão 10 vezes concentrada, 2 µl de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM, 1 µl do *primer* cM3W a 100 µM, 1µl dos *primers* espécie-específicos NVEE, NEEE, NWEE e NMAY (a 15 µM cada), 4 µl da mistura contendo 250 µM de cada dNTP e água suficiente para completar 50 µl. A mistura foi submetida a 25 ciclos térmicos iguais aos descritos para a primeira PCR.

#### 4.4.3. *Multiplex-Nested-PCR* para identificação de *Flavivirus*:

Foram realizadas duas M-N-PCR para identificação dos *Flavivirus*, conforme descrito no item 4.4.2., com a exceção dos *primers* usados. Uma M-N-PCR com os *primers* NDEN-1, NDEN-2, NDEN3, NYF-253 e NSLV, e outra M-N-PCR com NDEN-4, NROC, ILHV e WNV, ambas juntamente com o *primer* FG1 (1 µl de cada *primer* a 15 µM).

#### 4.4.4. *RT-Nested-PCR* para a identificação do vírus *Oropouche*:

A RT foi realizada pela adição de 8 µl de RNA em uma mistura contendo 4 µl de solução tampão cinco vezes concentrada (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 1,4 µl de DTT (*Dithiothreitol*) a 0,1 M, 1,6 µl da mistura contendo 250 µM de cada dNTP (*DeoxynucleosideTriphosphate*), 1 µl do *primer* BUN-C (a 15 µM), 20 U do inibidor de ribonuclease (RNaseOUT-Invitrogen, USA), 200 U de enzima transcriptase reversa (*Superscript II*-Invitrogen, USA) e água suficiente para completar 20 µl. A mistura foi incubada a 42°C por 50 min e a 70°C por 15 minutos.

A mistura de PCR consistiu de 8 µl do produto da RT, 5 µl da solução tampão 10 vezes concentrada (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 2 µl de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM, 4 µl da mistura contendo 250 µM de cada dNTP, 1 µl do *primer* BUN-C (a 15 µM) e 1 µl BUN-S (a 15 µM), 1 U da enzima polimerase (*Taq DNA polymerase recombinant*-Invitrogen, USA) e água suficiente para completar 50µl. A mistura foi submetida a 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min, finalizando com um ciclo de 72°C por 5 min. As reações de RT-PCR foram realizadas em termociclador GeneAmp ® PCR System 9700 (Applied Biosystem, USA).

A mistura da Nested-PCR consistiu de 1 µl do produto obtido na RT-PCR, 1 U da enzima polimerase, 5 µl da solução tampão 10 vezes concentrada, 2 µl de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM, 1 µl do *primer* BS-S a 15 µM, 1 µl do *primer* BS-C (15 µM), 4 µl da mistura contendo 250 µM de cada dNTP e água suficiente para completar 50 µl. A mistura foi submetida a 25 ciclos térmicos iguais aos descritos para a primeira PCR.

#### 4.4.5. Amostras de Tupã:

As amostras de Tupã foram analisadas para identificação dos *Flavivirus*, uma vez que, a cidade estava sob a vigência de uma epidemia de Dengue. A RT foi realizada pela adição de 8 µl de RNA em uma mistura contendo 4 µl de solução tampão cinco vezes concentrada (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 1,4 µl de DTT (*Dithiothreitol*) a 0,1 M, 1,6 µl da mistura contendo 250 µM de cada dNTP (*DeoxynucleosideTriphosphate*), 1 µl do *primer* FG2 (a 15 µM), 20 U do inibidor de ribonuclease (RNaseOUT-Invitrogen, USA), 200 U de enzima transcriptase reversa (*Superscript II*-Invitrogen, USA) e água suficiente para completar 20 µl. A mistura foi incubada a 42°C por 50 min e a 70°C por 15 minutos.

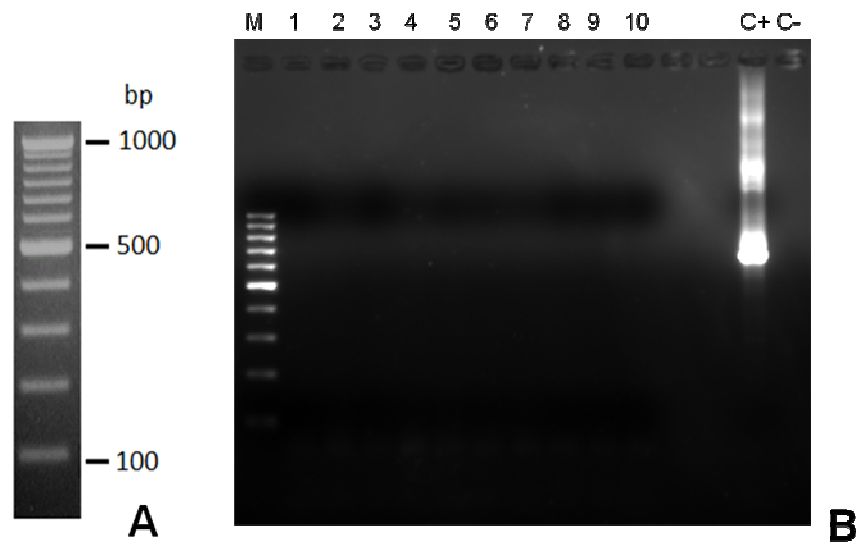
A mistura de PCR consistiu de 8 µl do produto da RT, 5 µl da solução tampão 10 vezes concentrada (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 2 µl de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM, 4 µl da mistura contendo 250 µM de cada dNTP, 1 µl do *primer* FG1 (a 15 µM), 1 U da enzima polimerase (*Taq DNA polymerase recombinant*-Invitrogen, USA) e água suficiente para completar 50 µl. A mistura foi submetida a 30 ciclos de 94°C por 1 min, 53°C por 1 min e 72°C por 2 min, finalizando com um ciclo de 72°C por 5 min. As reações de RT-PCR foram realizadas em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystem, USA).

Já N-PCR para identificação dos *Flavivirus* foi realizada conforme descrito no item 4.4.3.

#### 4.4.6. Eletroforese em Gel de Agarose:

Posteriormente, em todas as amostras realizou-se eletroforese em gel de agarose a 2% (peso/volume) com coloração de brometo de etídio, para se observar os amplicons à luz ultravioleta (AUSUBEL, 1997). Precauções para se evitar contaminações foram seguidas, e controles positivos e negativos foram utilizados em todas as reações (Figura13).





**Figura 13.** Eletroforese em gel de agarose. Em A: Padrão do peso molecular de 100 pb. Em B: Gel de agarose a 2% com o produto da Nested-PCR, submetido à corrida eletroforética, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador UV. Em M: marcador de peso molecular de 100 pb. Nas linhas seguintes (de 1 a 10) foram colocadas dez amostras. E, nas linhas C+ e C-, controle positivo utilizando o DENV-3 e controle negativo, respectivamente.

## ***RESULTADOS***

---

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análise Epidemiológica das amostras de Tupã

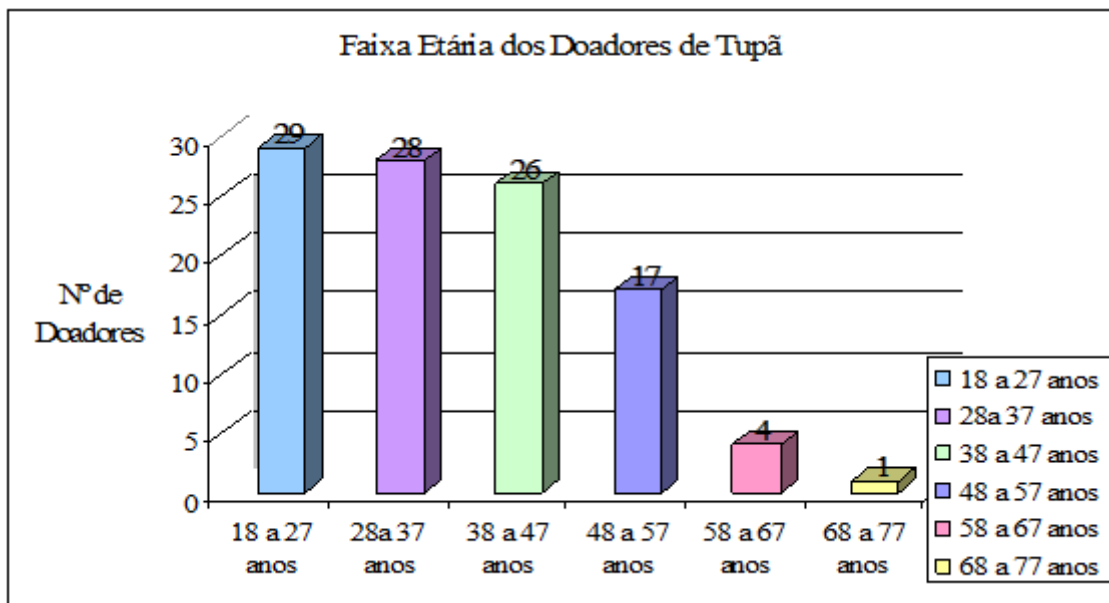
No ano de 2006, foram notificados ao Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac” do Estado de São Paulo, entre os meses de Janeiro a Julho, 272 casos de pacientes com suspeita de Dengue. A maior incidência de notificações ocorreu na décima sexta semana, com 42 casos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Distribuição dos casos notificados ao CVE de Tupã em 2006.

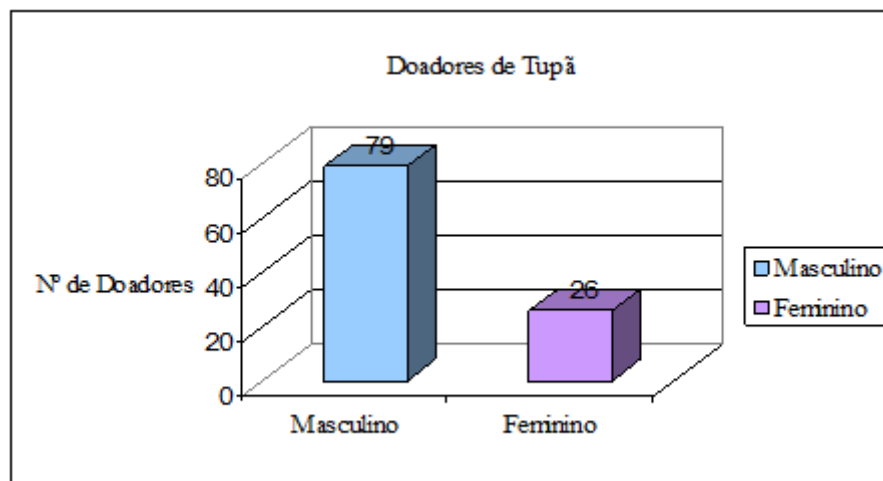
Mês	Semana	Amostras Notificadas
Janeiro	1	3
	2	0
	3	1
	4	2
Fevereiro	5	6
	6	6
	7	6
	8	10
Março	9	13
	10	6
	11	19
	12	17
Abril	13	12
	14	32
	15	32
	16	42
Maio	17	22
	18	24
	19	14
	20	1
Junho	21	1
	22	0
	23	2
	24	0
Julho	25	1
<b>Total</b>		<b>272</b>

Das 105 amostras provenientes de Tupã analisadas em relação em à faixa etária, 29 (27,62%) doadores tinham de 18 a 27 anos; 28 (26,67%) tinham idade entre 28 a 37 anos; 26 (24,76%) apresentavam de 38 a 47 anos; 17 (16,19%) doadores tinham entre 48 e 57 anos; 4 (3,81%) estavam na faixa etária de 58 a 67 anos; e 1 (0,95%) doador tinha 71 anos (Gráfico 2). Já, com relação ao gênero, 79 (75,24%) eram homens e 26 (24,76%) eram mulheres (Gráfico 3).

**Gráfico 3:** Distribuição das Amostras de Tupã em relação à Faixa Etária



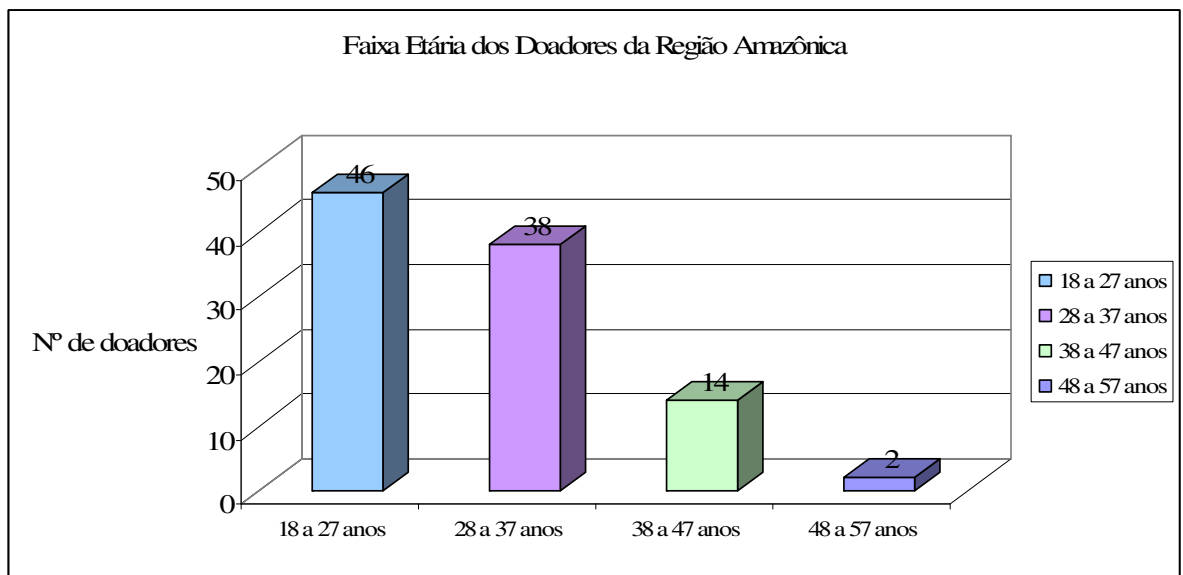
**Gráfico 4:** Distribuição das Amostras de Tupã em relação ao Gênero



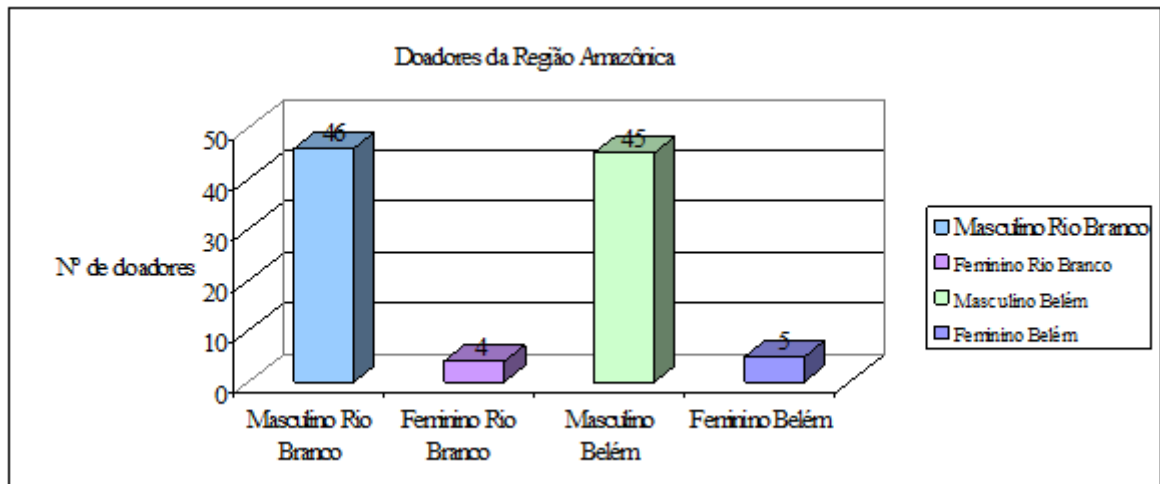
## 5.2. Análise Epidemiológica das amostras da Região Amazônica:

Em relação à faixa etária, das 100 amostras analisadas dos doadores da Região Amazônica, 46 eram de adultos com idade entre 18 a 27 anos, sendo 16 amostras de Belém e 30 de Rio Branco; 38 (23 de Belém e 15 de Rio Branco) tinham entre 28 a 37 anos; 14 (1 de Belém e 13 de Rio Branco) estavam na faixa de 38 a 47 anos; e 2 doadores de Rio Branco tinham idade de 48 a 57 anos (Gráfico 4).

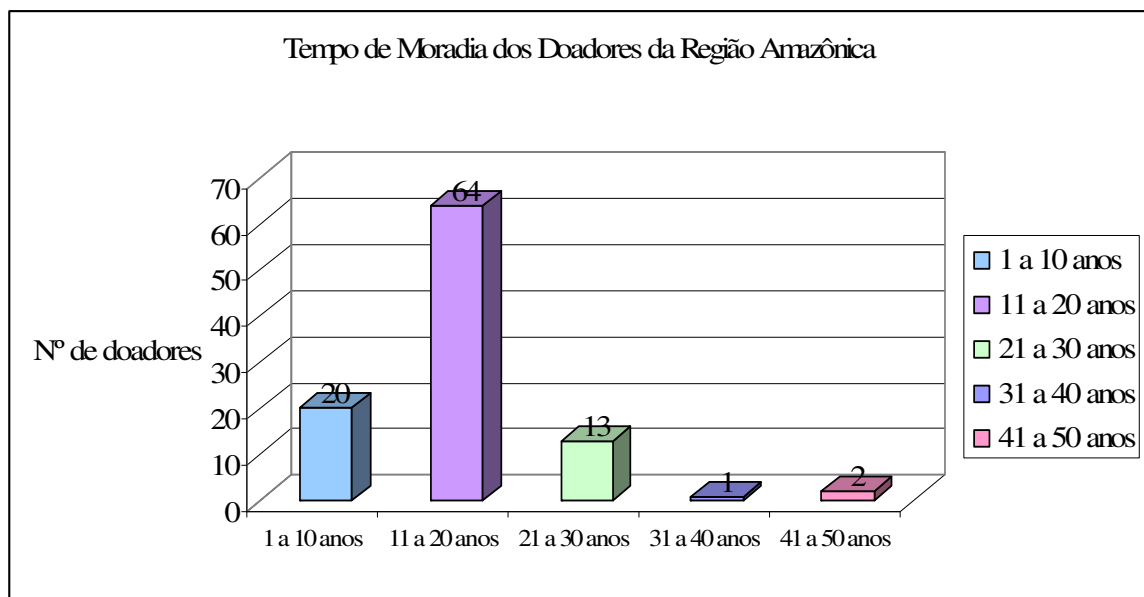
**Gráfico 5:** Distribuição das Amostras da Região Amazônica em relação à Faixa Etária



Quanto ao gênero, 91 eram homens, sendo 45 provenientes de Belém e 46 de Rio Branco; 5 amostras eram de mulheres oriundas de Belém e 4 de Rio Branco, totalizando 9 doadoras de sangue no ano de 2003 (Gráfico 5).

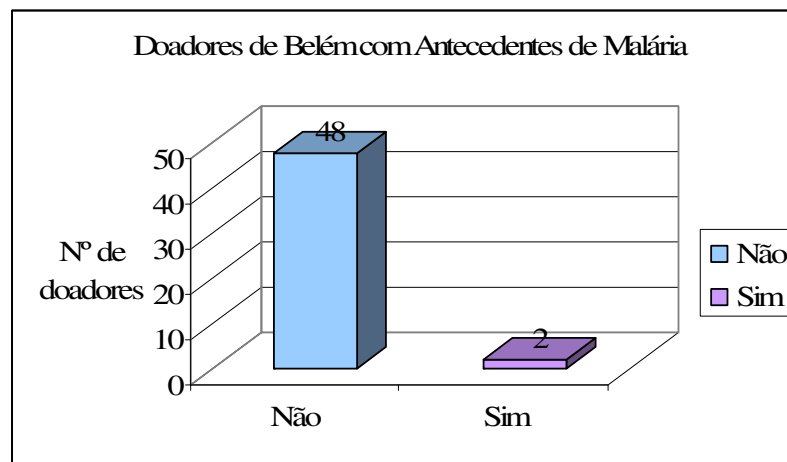
**Gráfico 6:** Distribuição das Amostras da Região Amazônica em relação ao Gênero

Quanto ao tempo de moradia em cada cidade, das 100 amostras provenientes da Região Amazônica, 20 doadores são residentes há menos 10 anos, sendo 9 de Belém e 11 de Rio Branco; 64 possuem tempo de residência de 11 a 20 anos (32 de Belém e 34 de Rio Branco); 13 entre 21 a 30 anos (6 de Belém e 7 de Rio Branco); 1 doador mora em Belém há 33 anos e 2 residem em Belém há mais de 45 anos (Gráfico 6).

**Gráfico 7:** Distribuição das Amostras da Região Amazônica em relação ao Tempo de Moradia

As amostras da Região Amazônica foram coletadas em janeiro de 2003, seguindo, portanto, a Resolução – RDC nº 343, de 13 de Dezembro de 2002, revogada pela Resolução – RDC nº 153, de 14 de Junho de 2004, que tem como Malária (Febre Quartã) uma das principais causas para inaptidão definitiva para doação de sangue, e apesar disto, dentre as 50 amostras de Belém, 2 eram de doadores com antecedentes da doença, sendo relatado um caso há 25 anos e um caso com 2 episódios da doença há pelo menos 15 anos (Gráfico 7).

**Gráfico 8:** Casos de Doadores da Região Amazônica com Episódios de Malária



### 5.3. Diagnóstico Molecular das Arboviroses:

Das 205 amostras clínicas de doadores de sangue, provenientes de região endêmica para arboviroses e da cidade de Tupã, durante uma epidemia de Dengue em 2006, analisadas, em 1220 reações, por PCR para os gêneros *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus*, para 15 tipos diferentes de espécies virais, nenhum arbovírus foi detectado (Tabela 4).

**Tabela 4.** Análise das 205 amostras em 1220 reações

Reações das 205 Amostras	<i>Alphavirus</i>				Total
	+	<i>Flavivirus</i>	<i>Alphavirus</i>	<i>Orthobunyavirus</i>	
<i>Duplex-RT-PCR</i>	200	-	-	-	200
RT-PCR	-	420	-	200	620
<i>Multiplex-Nested-PCR</i>	-	400	100	100	400

**Total Geral: 1220**

## ***DISCUSSÃO***

---



## 6. DISCUSSÃO

As arboviroses em quase sua totalidade são zoonoses mantidas em ambiente silvestre. Conseqüentemente, as pessoas que mantêm contato com os focos enzoóticos dos arbovírus são as que correm maiores risco de adquirir a infecção. No entanto, certas arboviroses têm surgido periodicamente em áreas urbanas, sob forma epidêmica, tais como, Dengue, Oropouche, Mayaro e Rocio (TRAVASSOS-DA-ROSA et al., 1997).

Estima-se que cerca de 50 a 100 milhões de casos de dengue clássico, 500.000 casos de dengue hemorrágico e no mínimo 12.000 mortes são relatados no mundo (WHO, 2008). Além disso, documentou-se, nos EUA, a transmissão do vírus West Nile por transfusão sanguínea (PEALER et al., 2003), e em estudos realizados por Tsang (2002) e Tan et al. (2005) notificou-se a transmissão de DENV em transplante de órgãos e tecidos, comprovando, portanto, que a transmissão de arbovírus, principalmente de Dengue, possa ser mais comum do que se imagina.

Em Hong Kong um receptor apresentou quadro febril e uma severa trombocitopenia três dias após a transfusão. O doador, que era assintomático no momento da doação, apresentou sintomas da Febre do Dengue um dia após doar sangue. Uma amostra armazenada foi analisada por RT-PCR e a presença do vírus foi confirmada (CHUANG et al., 2008). Estudos realizados por Linnen e colaboradores (2008) em 2.994 amostras de doadores de sangue obtidas durante surto de Dengue em Honduras (de Setembro de 2004 a Janeiro de 2005), 4.858 amostras brasileiras (de Fevereiro a Abril de 2003) e em 5.879 amostras australianas (de Março a Setembro de 2003), evidenciaram que, por teste de TMA (Transcription-Mediated Amplification), 0,3% das amostras de Honduras e 0,06% das amostras brasileiras eram positivas para Dengue, e que por PCR, 0,27% das amostras de Honduras e 0,04% das amostras brasileiras eram positivas para Dengue, sendo as amostras da Austrália negativas para os dois testes. Já, de acordo com Mohammed et al. (2008), das 16.521 amostras testadas, aproximadamente 1 em 1000 doações de sangue contém o vírus Dengue, em um estudo realizado em Porto Rico no ano de 2005. Por teste de ELISA, 1 amostra foi IgM positiva e 9 foram IgG positivas, tendo, 4 destas, uma titulação  $\geq 1:163,840$ , sugerindo uma infecção de Dengue recente ou secundária. E, pela técnica de RT-PCR, 3 amostras foram positivas para DENV-2 e 1 amostra positiva para DENV-3.

Entretanto, comprovou-se também, que a transmissão de arbovírus por transfusão sanguínea irá depender de uma combinação de fatores: da quantidade e estabilidade do vírus,

do volume de sangue transfundido, da imunidade do receptor e do nível de viremia. Embora os níveis de viremia de Dengue em hospedeiros vertebrados sejam em torno de  $10^5$  a  $10^9$  cópias por mL (CHEN & WILSON, 2005), é provável que níveis inferiores e de menor duração ocorra durante infecções assintomáticas. Mohammed e colaboradores (2008) demonstraram a presença de cargas virais de  $2 \times 10^3$  a  $8 \times 10^7$  cópias por mL em doadores saudáveis. Além disso, vários estudos têm mostrado que a presença de infecção assintomática ou subclínica pode variar de 0,77 a 87%, dependendo da população estudada (OOI et al., 2006). Estima-se que para cada caso sintomático, pode haver 6.7 casos que são assintomáticos (CHEN & WILSON, 2005).

Nas amostras de Tupã, o risco de transmissão de arbovírus por transfusão sanguínea segue o modelo descrito por Kleinman et al. (1997) e Petersen et al. (1994), que é idêntico ao utilizado no trabalho de Biggerstaff & Petersen (2002), onde o risco de transmissão de WNV por transfusão, durante a epidemia de 1999 em Queens, foi estimado. Neste modelo, assume-se a porcentagem da população que é doadora de sangue durante uma epidemia e, que essas doações são distribuídas uniformemente ao longo do ano, produzindo, desta forma, a estimativa do número de possíveis doadores infectados. Levando em consideração que a cidade de Tupã possui 63 mil habitantes e que no ano de 2006 apresentou 272 casos de dengue, conclui-se, portanto, que 1822 casos foram assintomáticos, ou seja, 2,89% desta população. Considerando, que 2% da população de Tupã é doadora de sangue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008), e que, a epidemia ocorreu durante as 25 primeiras semanas do ano (aproximadamente 180 dias), e somando os casos sintomáticos e os assintomáticos, tem-se 42 possíveis doadores. Dividindo-se os dias da epidemia pelos dias do ano, obtêm-se 49% ou 20 possíveis doadores que poderiam ter se infectado durante os 180 dias. Usando um período de viremia de 10 dias e dividindo-se pelos dias da epidemia, tem-se, portanto, 1 possível doador virêmico no momento da doação.

Neste trabalho utilizamos uma complexa abordagem molecular para a detecção de arbovírus, porém o número de amostras analisadas pode ter sido pequeno em relação à população estudada. Rio Branco possui uma população de 290.639 habitantes e Belém de 1.408.847 hab. (IBGE, 2009), somando, juntas, um total de 1.699.486 habitantes, mais ainda, por se tratar de uma região endêmica para arboviroses, as 100 amostras podem não terem sido representativas. Já, no caso da epidemia registrada em Tupã em 2006, considerando 2% da população doadora de sangue, ou seja, 1260 habitantes, as 105 amostras estudadas representam 8,33% desta população.

Apesar da complexidade e número, a transmissão de arbovírus por transfusão sanguínea não foi detectada, sugerindo que o evento é raro. Diante disto, mais estudos são necessários a fim de que se avalie a prevalência de amostras virêmicas em doadores de sangue em um maior número de amostras e em outras regiões do país. É imprescindível que se estabeleçam as reais taxas de transmissão através de doadores virêmicos para que se possa, então, avaliar as consequências clínicas para o receptor e para prevenção de possíveis arboviroses transfusionais.

***CONCLUSÃO***

---

## 7. CONCLUSÃO

- Na análise das amostras clínicas de doadores de sangue da Região Amazônica e da cidade de Tupã, através da técnica de RT-PCR, nenhuma amostra foi positiva para arbovírus, sugerindo que a transmissão de arboviroses transfusionais não está ocorrendo na população estudada.
-

## ***REFERÊNCIAS***

---

## 8. REFERÊNCIAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 153, de 14 de junho de 2004. Legislação em Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=11662>. Acesso em 03 de Março de 2008.
- AUSUBEL, F.B.R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A. Preparation and analysis of DNA. In: (Ed.) short protocols in molecular biology John Wiley & Sons, Inc, 1997.
- AZEVEDO, R.S.S.; NUNES, M.R.T.; CHIANG, J.O.; BENSABATH, G.; VASCONCELOS, H.B.; PINTO, A.Y.N.; MARTINS, L.C.; MONTEIRO, H.A.O.; RODRIGUES, S.G.; VASCONCELOS, P.F.C. Reemergence of Oropouche fever, northern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n.6, 2007.
- BATISTA, W.C. **Mapeamento de arboviroses do Estado de Rondônia**. Manaus, 2007. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, 2007
- 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**, v.42, p.1019-1026, 2002.
- BISHOP, D.H.L.; SHOPE, R.E. Bunyaviridae. In: FRAENKEL-CONRAT, H.; WAGNER, R.R. **Comprehensive virology**. New York: Plenum Press, v. 14, p. 1-156, 1979.
- BOSCH, I.; HERRERA, F. et al. West Nile virus, Venezuela. **Emerg Infect Dis**, v.13, n.4, Apr, p.651-653, 2007.
- BRONZONI, R.V.; MORELI, M.L et al. Multiplex nested PCR for Brazilian Alphavirus diagnosis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.98, n.8, Aug, p.456-461, 2004.

- BRONZONI, R.V.M.; BALEOTTI, F.G.; NOGUEIRA, R.M.R.; NUNES, M.; FIGUEIREDO, L.T.M. Duplex Reverse Transcription-PCR followed by Nested PCR assays for detection and identification of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.2, p.696-702, 2005.
  
- BRUNO-LOBO, G.G.; BRUNO-LOBO, M.; TRAVASSOS, J.; PINHEIRO, F.; PAZIN, I.P. Estudos sobre arbovirus III. Isolamento de um vírus sorologicamente relacionado ao subgrupo Western-Sindbis de um caso de encefalomielite equina ocorrido no Rio de Janeiro. **An Microbiol.** Rio de Janeiro, v.9, p.183-195, 1961.
  
- CALISHER, C.H.; KINNEY, R.H.; SOUZA LOPES, O.; TRENT, D.N.; MONATH, T.P.; FRANCY, D.B. Identification of a new Venezuelan equine encephalitis virus from Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v.31(6), p.1260-1272, 1982.
  
- CARRAZZONE, C.F.V.; BRITO, A.M.; GOMES, Y.M. Importância da avaliação sorológica pré-transfusional em receptores de sangue. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.26, n.2, São José do Rio Preto, 2004.
  
- CASTRO, C.M.O.; PINTO, E.V.; COSTA, L.R.O.; CRUZ, A.C.R.; RODRIGUES, S.G.; VASCONCELOS, P.F.C. Utilização da RT-PCR na detecção de *Alphavirus* isolados na Amazônia Brasileira. **XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2005.
  
- CAUSEY, O.R. & MAROJA, O.M. Mayaro virus: a new human disease agent. III. Investigation of an epidemic of acute febrile illness on the river Guama in Pará, Brazil and isolation of Mayaro virus as causative agent. **Amer. J. trop. Med. Hyg.**, v.6, p.1017-1023, 1957.
  
- CDC - Center Disease Control. West Nile virus infection: information for clinicians. MMWR 2002. Available from: URL: [http://www.cdc.gov/incidod/dvbid/westnile/resources/fact\\_sheet.clinicians.htm](http://www.cdc.gov/incidod/dvbid/westnile/resources/fact_sheet.clinicians.htm). Acesso em 10 de abril de 2009.



- CDC - Center Disease Control. Map shows the distribution of Human cases occurring from 1964 though 2006 with number of human cases if any, by state. If Saint Louis Encephalitis is reported to CDC from any area of a state, that entire state is shaded, 2007. Disponível em: [http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/sle/MapsActivity/Sle\\_SurvControl.html](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/sle/MapsActivity/Sle_SurvControl.html). Acesso em 22 de Maio de 2008.
- CDC - Center Disease Control. 2003 West Nile Virus Viremic Blood Donor Activity in the United States. Disponível em: [http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/Mapsviremic/surv&control03Maps\\_Viremic.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/Mapsviremic/surv&control03Maps_Viremic.htm). Acesso em 22 de Maio de 2009.
- CDC - Center Disease Control. 2009 West Nile Virus Viremic Blood Donor Activity in the United States (Reported to CDC as of December 1, 2009). Disponível em: [http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/Mapsviremic/surv&control09Maps\\_Viremic.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/Mapsviremic/surv&control09Maps_Viremic.htm). Acesso em 22 de Maio de 2009.
- CDC - Center Disease Control. 2008 Dengue Risk areas. Disponível em: [http://www.dengueinfo.net/html/risk\\_areas.html](http://www.dengueinfo.net/html/risk_areas.html). Acesso em 22 de Maio de 2008.
- CDC - Center Disease Control. The Pre-Travel Consultation Travel-Related Vaccine-Preventable Diseases, 2009. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2010/chapter-2/yellow-fever.aspx>. Acesso em 10 de Abril de 2009.
- CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica. Casos Autóctones Confirmados de Dengue por Município e por Semana Epidemiológica ano 2006 no Estado de São Paulo. Disponível em: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/hmtm/zoo/den\\_1se06.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/hmtm/zoo/den_1se06.htm). Acesso em 03 de Agosto de 2009.
- CHEN, L.H.; WILSON, M.E. Nosocomial dengue by mucocutaneous transmission. **Emerg Infect Dis.**, v.11, p.775, 2005.

- CHUANG, V.M.; WONG, T.Y.; LEUNG, Y.H. Review of dengue fever cases in Hong Kong during 1998 to 2005. **Hong Kong Medical Journal**, v.14, p.170-177, 2008.
- COIMBRA, T.L.M.; SANTOS, C.L.S.; SUZUKI, A.; PETRELLA, S.M.C.; BISORDI, I.; NAGAMOR, A.H.; MARTI, A.T.; SANTOS, R.N.; FIALHO, D.M. LAVIGNE, S.; BUZZAR, M.R.; ROCCO, I.M. Mayaro virus: Imported cases of human infection in São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 49, p.221-224, 2007.
- DEGALLIER, N.; TRAVASSOS-DA-ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C.; SÁ FILHO, G.C.; TRAVASSOS-DA-ROSA, E.S.; RODRIGUES, S.G.; et al. **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Belém: Evandro Chagas Institute, 1998.
- FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. **Virus taxonomy** – eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, p. 1164, 2005.
- FIGUEIREDO, L.T.M. **Os Arbovirus do Brasil**. Anais da Segunda Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisadores Nikkeis, Sessão III- Virologia, São Paulo, 16 de agosto de 1994, p. 45-58, 1994.
- FIGUEIREDO, L.T.M. Brazilian Viruses in the Family Bunyaviridae. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 32, p. 154-158, 1999.
- FIGUEIREDO, L.T.M. The Brazilian Flavivirus. **Microbes and Infection**, v.2, p. 1643-1649, 2000.
- FIGUEIREDO, L.T.M.; FONSECA, B.A.L. Febre Amarela. In: VERONESI **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 3ed, p.389-397, 2005.
- FIGUEIREDO, L.T.M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.

- FIGUEIREDO, R.M.P.; NAVECA, F.G.; BASTOS, M.S.; MELO, M.N.; VIANA, S.S.; MOURÃO, M.P.G.; COSTA, C.A.; FARIAS, I.P. Dengue Virus type 4, Manaus, Brazil. **Emerg Infect Dis** [serial on the Internet]. 2008 Apr [date cited]. Available from <http://www.cdc.gov/EID/content/14/4/667.htm>.
- FONSECA, B.F.; FIGUEIREDO, L.T.M. Febre Amarela In: (Ed.). VERONESI: **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, p.251-257, 1996.
- FONSECA, B.F.; FIGUEIREDO, L.T.M. Dengue In: (Ed.). VERONESI: **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, p.343-356, 2005.
- FULOP, L.; BARRETT, A.D.T.; PHILLPOTTS, R.; MARTIN, K.; LESLIE, D.; TITBALL, R.W. Rapid identification of flaviviruses based conserved NS5 gene sequences. **Journal of Virology Methods**, v. 44, p. 179-188, 1993.
- GRIFFIN, D.E. Alphaviruses. In: Knipe DM, Howley PM. **Fields Virology**.4<sup>th</sup> ed.Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p.917-62, 2001.
- GOULD, E.A. & SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. **Lancet**, v.371, n.9611, Feb 9, p.500-509. 2008.
- GUBLER, D.J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Arch Med Res**; v.33, p.330-342, 2002.
- HARRINGTON, T.; KUEHNERT, M.J.; KAMEL, H.; LANCIOTTI, R.S.; HAND, S.; CURRIER, M.; CHAMBERLAND, M.E.; PETERSEN, L.R.; MARFIN, A.A. West Nile virus infections transmitted by blood transfusion. **Transfusion** 2003; v.43, p.18-22, 2003.
- HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The Dengue viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.3, p.376-396, 1990.

- HOWARD-RUBEN, J. The West Nile virus: an emerging health challenge. **NOS News**, v.18, p.3-13, 2003.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades. Histórico da cidade de Tupã, 2001. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Acesso em 03 de Maio de 2009.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Mapa mostrando a localização das cidades de Rio Branco/AC e Belém/PA em relação à Região Norte do Brasil, 2007. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/ibgeteen/mapas/imagens/regiao\\_norte\\_gde.gif](http://www.ibge.gov.br/ibgeteen/mapas/imagens/regiao_norte_gde.gif). Acesso em 11 de Novembro de 2009.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades. Informações estatísticas, 2009. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Acesso em 11 de Novembro de 2009.
- IEC – Instituto Evandro Chagas. Annual Report: 1995-1998. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1999.
- IVERSSON, L.B.; TRAVASSOS-DA-ROSA, A.P.A.; TRAVASSOS-DA-ROSA, J.; COSTA, C.S. Estudos sorológicos para pesquisa de anticorpos de arbovírus em população da região do Vale do Ribeira. III Inquérito em cohabitantes com casos de encefalite por Flavivírus Rocio. **Rev Saúde Publ.**, v.16, p.160-170, 1982.
- IVERSSON, L.B.; TRAVASSOS-DA-ROSA, A.P.A.; RODRIGUES, S.G.; ROSA, M.D.B. Human disease caused by Venezuelan equine encephalitis subtype IF in Ribeira Valley, São Paulo, Brazil. In: **Annual meeting of the american society of tropical medicine and hygiene**, v.39, New Orleans, 1990. Abstract. p. 143.
- KARABATSOS, N. International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 3rd ed., San Antônio, p. 1147, 1985.

- KLEINMAN, S.; BUSH, M.P.; KORELITZ, J.J.; SCHREIBER, G.B. The incidence/window period model and its use to assess the risk of transfusion-transmitted human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infection. **Transfusion Med Rev.**, v.11, p.155-172, 1997.
- KOTAIT, I.; BRANDÃO, P.E.; CARRIERI, M.L. Vigilância Epidemiológica das Encefalites Equinas. **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)**, ano 3, n.29, 2006.
- KRAMER, L.D.; STYER, L.M, et al. A Global Perspective on the Epidemiology of West Nile Virus. **Annu Rev Entomol**, v.53, Jan 7, p.61-81, 2008.
- LINNEN, J.M.; VINELLI, E.; SABINO, E.C.; TOBLER, L.H.; HYLAND, C.; LEE, T.; KOLK, D.P.; BROULIK, A.S.; COLLINS, C.S.; LANCIOTTI, R.S.; BUSCH, M.P. Dengue viremia in blood donors from Honduras, Brazil, and Australia. **Transfusion**, v.48, p.1355-1362, 2008.
- MERTZ, G.J. Bunyaviridae: bunyaviruses, phleboviruses, nairoviruses, and hantaviruses. In: RICHMAN DD; WHITLEY RJ & HAYDEN FG, eds. **Clinical virology**, p. 943-972, Churchill Livingstone, New York, 1997.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Aspectos epidemiológicos da Febre Amarela. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/saude/> Acesso em 10 de novembro de 2008.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Caderno de informação: sangue e hemoderivados produção hemoterápica: Sistema Único de Saúde – SUS (serviços públicos e privados contratados) e serviços privados não contratados ao SUS / Ministério da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 94 p.
- MOHAMMED, H.; LINNEN, J.M.; MUÑOZ-JORDÁN, J.L.; TOMASHEK, K.; FOSTER, G.; BROULIK, A.S.; PETERSEN, L.; STRAMER, S.L. Dengue virus in blood donations, Puerto Rico, 2005. **Transfusion**, v.48, p.1348–1354, 2008.

- MONDINI, A.; CARDEAL, I.L.S.; LÁZARO, E.; NUNES, S.H.; MOREIRA, C.C.; RAHAL, P.; MAIA, I.L.; FRANCO, C.; GÓNGORA, D.V.N.; GÓNGORA-RUBIO, F.; CABRERA, E.M.S.; FIGUEIREDO, L.T.M.; DA FONSECA, F.G.; BRONZONI, R.V.M.; CHIARAVALLOTI-NETO, F.; NOGUEIRA, M.L. Saint Louis Encephalitis Virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. v.13, n.1, 2007a.
- MONDINI, A.; BRONZONI, R.V.M.; CARDEAL, I.L.S.; SANTOS, T.M.I.L.; LÁZARO, E.; NUNES, S.H.P.; SILVA, G.C.D.; MADRID, M.C.F.S.; RAHAL, P.; FIGUEIREDO, L.T.; CHIARAVALLOTI-NETO, F.; NOGUEIRA, M.L. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v.40, p. 84-86, 2007b.
- MORELI, M.L.; AQUINO, V.H.; CRUZ, A.C.R.; FIGUEIREDO, L.T.M. Diagnosis of Oropouche Virus Infection by RT-Nested-PCR. **Journal of Medical Virology**, v.66, p.139-142, 2002.
- NEEL, J.V.; ANDRADE, A.H.P.; BROWN, G.E. *et al.* Further studies of the Xavante Indians. IX. Immunologic status with respect to various diseases and organisms. **Amer. J. trop. Med. Hyg.**, v.17, p.486-498, 1968.
- OOI, E.E.; GOH, K.T. & GUBLER, D.J. Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p.887-893, 2006.
- PEALER, L.N.; MARFIN, A.A.; PETERSEN, L.R.; LANCIOTTI, R.S.; PAGE, P.L.; STRAMER, S.L.; STOBTERSKI, M.G.; STGNS, K.; NEWMAN, B.; KAPOOR, H.; GOODMAN, J.L.; CHAMBERLAND, M.E. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the Unites States in 2002. **New England Journal of Medicine**, v.349, p.236-245, n.13, 2003.
- PINHEIRO, F. P.; PINHEIRO, M.; BENSABATH, G.; CAUSEY, O. R.; SHOPE, R. Epidemia de vírus Oropouche em Belém. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, v.12, n.1, p.13-23, 1962.

- PINHEIRO, F.P.; FREITAS, R.B.; TRAVASSOS-DA-ROSA, J.F. et al. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological findings. **Amer.J. trop. Med. Hyg.**, v.30, p.674-681, 1981.
  
- PINHEIRO, F.P. Situação das arboviroses na região amazônica. **International Symposium on Tropical Arboviruses and Haemorrhagic Fevers**. Belém: Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, p. 27-48, 1982.
  
- PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS-DA-ROSA, A.P.A.; FREITAS, R.B. et al. - Arboviruses: Aspectos clínicos epidemiológicos. In: **Instituto Evandro Chagas 1936-1986. 50 Anos de Contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical**. Belém, Fundação SESP, v.1, p. 375-408, 1986.
  
- PINHEIRO, F.P. & TRAVASSOS-DA-ROSA, J.F.S. Febres hemorrágicas viróticas. Febre hemorrágica do dengue. In: **Tratado de Infectologia** (R. Veronesi & R. Focacia, org.), São Paulo: Editora Atheneu, p. 258-263, 1996.
  
- PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS-DA-ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C. Febre por Oropouche. In: Leão, R.N.Q. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico**. Belém: CEJUP, p.285-298, 1997.
  
- PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS-DA-ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C. Oropouche fever. In: FEIGIN, R.D. (Ed.). **Textbook of pediatric infectious diseases**. Philadelphia: Saunders, p. 2418-2423, 2004.
  
- PETERSEN, L.R.; SATTEN, G.A.; DODD, R. et al. Duration of time from onset of human immunodeficiency virus type 1 infectiousness to development of detectable antibody. The HIV Seroconversion Study Group. **Transfusion**, v.34, p.283-284, 1994.
  
- PFEFFER, M.; PROEBSTER, B.; KINNEY, R.M.; KAADEN, O.R. Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical and Medicine Hygiene**, v.57, p.709-718, 1997.

- REINA, M.C.F.P.; FREITAS, A.C.; FERNANDES, F.C.; SILVA, J.A.M.; GARCIA, M.H.O.; LISE, M.L.Z.; KATZ, G.; SPINOLA, R. Investigação de casos de Encefalite Viral de Saint Louis, notificados no município de São José do Rio Preto – SP, agosto de 2006. Nota técnica – Secretária de Estado da Saúde/Coordenadoria de Controles de Doenças/Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, 2006.
- ROCCO, I.M.; SANTOS, C.L. et al. St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in Sao Paulo State, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.47, n.5, Sep-Oct, p.281-285, 2005.
- RODHAIN, F.; ROSEN, L. Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed.). **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. New York: CAB International, 1997, p. 45-60.
- ROTHMAN, A.L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **J Clin Invest**, v.113, p.946-951, 2004.
- SANMARTIN, C.; MACKENZIE, R.B.; TRAPIDO, H.; BARRETO, P.; MULLAMAX, C.H.; GUTIERREZ, E.; LESMES, C. Encefalitis equina Venezolana en Colombia. **Bol Ofic Sanit Panam** 1967; 74:108-37.
- SBI – Sociedade Brasileira de Infectologia. Casos de encefalite de Saint Louis no interior de São Paulo, 2006. Disponível em: [http://www.infectologia.org.br/default.asp?site\\_Acao=mostraPagina&paginaId=134&mNoti\\_Acao=mostraNoticia&noticiaId=165](http://www.infectologia.org.br/default.asp?site_Acao=mostraPagina&paginaId=134&mNoti_Acao=mostraNoticia&noticiaId=165). Acesso em 03 de março de 2008.
- SES-SP - Secretaria Estadual de Saúde de São Paulo. Dengue. Disponível em: <http://portal.saude.sp.gov.br/homepage.mmp?home=402881b40e9f7c76010ea499333c0037>. Acesso em 13 de Novembro de 2009.
- SEYMOUR, C.; DICKERMA, R.W.; MARTIN, M.S. Venezuelan encephalitis virus infection in neotropical bats. I. Natural infection in a Guatemala enzootic focus. **Am J Trop Med Hyg**, v. 27, p.290-296, 1978.



- SINGHI, S.; KISSOON, N.; BANSAL, A. Dengue e dengue hemorrágico: aspectos do manejo na unidade de terapia intensiva. **Jornal de Pediatria**, v.83, n.2, Porto Alegre, 2007.
- SOLOMON, T.; OOI, M.H.; BEASLY, D.W.C.; et al. West Nile Encephalitis. **BMJ.**, v.326, p.865-869, 2003.
- SUCEN – Superintendência de Controle de Endemias. Vetores e Doenças – Febre Amarela, 2008. Disponível em: <<http://www.sucen.sp.gov.br/atuac/febrea.html>>. Acesso em 02 de março de 2008.
- TAN, F.L.S.; LOH, D.L.S.K.; PRABHAKARAN, K. Dengue haemorrhagic fever after living donor renal transplantation. **Nephrol Dial Transplant**, v.20, p.447-448, 2005.
- TERZIAN, A.C.B.; BRONZONI, R.V.M.; DRUMOND, B.P.; NUNES, M.S.; SILVA, N.S.; FERREIRA, M.U.; SPERANCA, M.A.; NOGUEIRA, M.L. Sporadic Oropouche Vírus Infection, Acre, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n.2, p. 348-350, 2009.
- TRENT, D.W.; MONATH, T.P.; BOWEN, G.S. et al. Variation among strains of St. Louis encephalitis virus: Basis for a genetic, pathogenic and epidemiologic classification. **Ann NY Acad Sci**, 354:219, 1980.
- TRAVASSOS-DA-ROSA, A.P.A.; TRAVASSOS-DA-ROSA, J.F.S.; PINHEIRO, F.P.; VASCONCELOS, P.F.C. **Arboviroses** In: LEÃO, RNQ. Doenças Infecciosas e Parasitárias: enfoque amazônico. Belém: CEJUP, p.207-226, 1997.
- TSANG, C. Public health and epidemiology bulletin. Hong Kong, China: **Department of health**, 2002.
- UNIVERSIA BRASIL. Localização da cidade de Tupã no Estado de São Paulo, 2004. Disponível em: <http://www.universia.com.br/materia/materia.jsp?id=4159>. Acesso em 03 de Maio de 2009.

- VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; et al. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, California, p.1162, 2000.
- VASCONCELOS, P.F.; TRAVASSOS-DA-ROSA, J.F.S. et al. Epidemiology of encephalitis caused by arbovirus in the Brazilian Amazonia **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.33, n.6, Nov-Dec, p.465-476, 1991.
- VASCONCELOS, P.F. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazônia. **Ciênc. Cult** **44**, p.117-124, 1992.
- VASCONCELOS, P.F.; TRAVASSOS-DA-ROSA, A.P.A.; PINHEIRO, F.P.; SHOPE, R.E.; TRAVASSOS-DA-ROSA, J.F.S.; [RODRIGUES, S.G.](#) et al. Arboviruses pathogenic for man in Brazil In: TRAVASSOS-DA-ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS-DA-ROSA, J.F.S. **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Belém, Instituto Evandro Chagas, p.72-99, 1998.
- VASCONCELOS, P.F.; TRAVASSOS-DA-ROSA, A.P.A.; PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS-DA-ROSA, J.F.S. Arboviroses. In: (Ed.). VERONESI: **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, p.289-302, 2005.
- VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS-DA-ROSA, A.P.A.; PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS-DA-ROSA, J.F.S. **Arboviroses**. In: VERONESI: **Tratado de Infectologia**, 3ed. p.289-302. São Paulo: Atheneu, 2006.
- WEAVER, S.E.; FERRO, C.; BARRERA, R.; BOSHELL, J.; NAVARRO, J.C. Venezuelan equine encephalitis. **Ann Ver Entomol.**, v.49, p.141-174, 2004.
- WHO - World Health Organization. Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. **WHO Fact Sheet**. WHO, Geneva, 2008.

- WIDER-SMITH, A.; CHEN, L.H.; MASSAD, E.; WILSON, M.E. Threat of Dengue to Blood Safety in Dengue-Endemic Countries. **Emerging Infect Diseases**, v.15, p.8-11, 2009.
- ZANOTTO, P.M.A.; GOULD, E.A.; GAO, G.F.; HARVEY, H.P.H.; HOLMES, E.C. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.93, p.548-553, 1996.

***ANEXO***

---

## 9. ANEXO – Artigo aceito para publicação



### ARBOVIRUSES IN BLOOD DONORS: A Study in Amazon region and in a small city with a Dengue outbreak

Journal:	<i>Transfusion Medicine</i>
Manuscript ID:	TME-2009-0195
Manuscript Type:	Letter to the Editor
Date Submitted by the Author:	26-Nov-2009
Complete List of Authors:	Lavezzo, Liqia; FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Laboratório de Pesquisa em Virologia Santana, Vinícius; FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Laboratório de Pesquisa em Virologia Terzian, Ana Carolina; FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Laboratório de Pesquisa em Virologia Mondini, Adriano; FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Laboratório de Pesquisa em Virologia Bronzoni, Roberta; FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Laboratório de Pesquisa em Virologia Sperança, Marcia; Universidade Federal do ABC (UFABC), Centro de Ciências Naturais e Humanas Dias, Sergio; Faculdade de Medicina de Marília, Biologia Rossit, Andrea; Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, DDIP Machado, Ricardo; Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, DDIP Nogueira, Mauricio; FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Laboratório de Pesquisa em Virologia
Keywords:	dengue, arboviruses, blood donors



## LETTER TO THE EDITOR

## Arboviruses in blood donors: a study in the Amazon region and in a small city with a dengue outbreak

Dear Sir,

Arboviruses are an ecological group of viruses which represent a very important public health problem worldwide. Very often, arboviruses have been responsible for large epidemics with serious impacts on human and veterinary health (Vasconcelos, 1992). Dengue virus (DENV) is considered the most important arbovirus which infects humans. DENV, serotypes 1–4, is responsible for large urban outbreaks, especially when the co-circulation of different serotypes is observed or when a new serotype is introduced (Figueiredo, 2000).

A high number of asymptomatic cases, the asymptomatic viraemia in the early stage of infection and a high viral transmission during outbreaks are the main factors that may contribute towards a substantial number of blood donors to be viraemic at the time of donation (Mohammed *et al.*, 2008). Therefore, the aim of this study was to evaluate the potential for transmission of arboviruses in serum samples of blood donors from the Amazon region and from a small city in the São Paulo State (Tupã) with DENV outbreak.

A total of 205 clinical samples (aliquots from collected blood) from blood donors were obtained during January 2006 in Belém, Pará (50 samples), Rio Branco, Acre (50 samples) and Tupã, São Paulo (105 samples) in Brazil. All samples were collected according to Brazilian regulations for blood donation and were concluded to be suitable for donation. None of the blood donors had fever or any other clinical sign of infection. All samples were initially tested for the presence of *Flavivirus* and *Alphavirus* using the procedure described by Bronzoni *et al.* (2005). Briefly, firstly *Flavivirus* and *Alphavirus* genus-specific primers were used simultaneously in a duplex reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. Secondly, three multiplex nested-PCRs with species-specific primers were used to identify DENV 1–3, yellow fever virus and Saint Louis encephalitis virus; to identify DENV-4, Rocio

virus, Iheus virus and West Nile virus (WNV); and to detect Venezuelan equine encephalitis virus, Eastern equine encephalitis virus, Western equine encephalitis virus and Mayaro virus. Finally, a RT-PCR followed by a nested-PCR assay was used to identify Oropouche virus. The samples collected in Tupã were tested only for Dengue virus, as no other arbovirus is endemic in this region. Despite the fact that 1220 PCRs were performed in these samples covering about 15 different viruses, no arboviruses were detected.

DENV and WNV are similar in some respects, supporting the hypothesis that dengue can be transfusion transmitted: both flaviviruses are efficiently transmitted to humans via the bite of infected mosquitoes; a large proportion of infections are asymptomatic; levels of viraemia during the incubation phase can exceed  $10^6$  virions per mL (Rothman, 2004) and the transmission of both has been documented after organ transplantation and accidents involving health care workers (Chen & Wilson, 2005; Linnen *et al.*, 2008). On the contrary, some authors suggest that the viraemia in dengue infections can be lower than that in WNV infections during incubation (Mohammed *et al.*, 2008). In this way, testing of pool samples for WNV infection may not be as useful as in dengue infection.

Various studies have shown the presence of asymptomatic or subclinical infection, which can range from 0.77 to 87% depending on the population studied (Ooi *et al.*, 2006). It is estimated that for every one symptomatic case, there can be 6.7 cases that are asymptomatic (Chen & Wilson, 2005). The risk estimates for dengue transfusion transmission in our Tupã samples are identical to that used by Biggerstaff & Petersen (2002), when they estimated the risk of transmission of WNV by transfusion during the 1999 epidemic in Queens, New York City. Assuming that 5% of the population donates blood in the outbreak year and that these donations are evenly distributed over the year, the window-period approach yields estimates of the number of infectious donors as follows. Consider that our study population was the population of Tupã during the 2006 outbreak, with 63 000 habitants and 272 cases of dengue virus. Then, 5% of these, or 105, would be donors, and  $180 \div 365 = 49\%$  of these, or 51, would

Correspondence: Maurício L. Nogueira, Laboratório de Pesquisa em Virologia, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, 15090-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.  
Tel.: +55 21 17 3201 5731; +55 17 3201 5741  
E-mail: mauricio.nogueira@pq.cnpq.br

*Letter to the Editor*

be donors who became infected during the 180 days of the outbreak. Using a window period of 10 days (the mean of our assumed distribution for the time from onset of viraemia to symptom onset) and noting that the outbreak was 180 days long,  $10 \div 180 =$  roughly five of these would donate during their window period and so would be infectious. Using a more conservative model (2% donation), at least 1–2 people with dengue should be detected in this study.

As the numbers continue to increase, the effect on blood donor attendance will reach levels sufficient enough to impact significantly on the blood supply (Teo *et al.*, 2009). Recent studies reported viraemia in blood donations. In Puerto Rico, nearly 1 in 1000 donations was positive for the presence of dengue viral nucleic acid by TMA. Furthermore, live virus was recovered from 3 of the 12 TMA-positive donations, indicating that at least these three were capable of transmitting infection to recipients (Mohammed *et al.*, 2008). In the second study, samples from blood donors in Honduras, Brazil and Australia were obtained during periods of clinical dengue outbreaks and screened using the dengue-specific TMA assay (Linnen *et al.*, 2008). Nine (0.30%) of 2994 Honduran samples tested positive, of which eight were confirmed by RT-PCR. Three (0.06%) of 4858 Brazilian samples tested positive, of which two were RT-PCR positive (Linnen *et al.*, 2008).

In this study, we make a comprehensive PCR approach to detect arboviruses in blood donors. We tested several arboviruses that are endemic in the region, but we do not detected any of them by PCR. It is clear that the sample numbers should be increased, but the lack of detection of the virus in 100 samples suggests that the possibility of transmission of these viruses without an epidemic of these diseases should not be important. On the contrary, we also tested samples from a small city in São Paulo State with a dengue virus outbreak. As described earlier, according to mathematical models we were supposed to find about two to five positive samples in our study, but none was detected. This data also suggest that these models need to be further investigated and also be tested in a more comprehensive context to validate them and also to evaluate the real danger of transmission of arboviruses by blood donors in both endemic and epidemic regions.

**ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP, Grant # 08/03828-1 to M. L. N.) and Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). M. L. N. is supported by a CNPq Fellowship.

L. C. LAVEZZO,<sup>1,2</sup> V. DOS SANTOS SANTANA,<sup>1,2</sup> A. C. B. TERZIAN,<sup>1</sup> A. MONDINI,<sup>1</sup> R. V. DE MORAES BRONZONI,<sup>1</sup> M. SPERANÇA,<sup>3</sup> S. M. Z. DIAS,<sup>4</sup> A. R. B. ROSSIT,<sup>5</sup> R. L. D. MACHADO<sup>5</sup> & M. L. NOGUEIRA<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Virologia, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), Vila São Pedro, São José do Rio Preto, <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, UNESP, São José do Rio Preto, <sup>3</sup>Universidade Federal do ABC (UFABC), Rua Santa Adélia, Santo André, <sup>4</sup>Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA), Marília, and <sup>5</sup>Departamento de Doenças Dermatológicas, Infeciosas e Parasitárias da, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), Vila São Pedro, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

**REFERENCES**

- Biggerstaff, B.J. & Petersen, L.R. (2002) Estimated risk of West Nile virus transmission through blood transfusion during an epidemic in Queens, New York City. *Transfusion*, **42**, 1019–1026.
- Chen, L.H. & Wilson, M.E. (2005) Nosocomial dengue by mucocutaneous transmission. *Emerging Infectious Diseases*, **11**, 775.
- Figueiredo, L.T.M. (2000) The Brazilian flaviviruses. *Microbes and Infection*, **2**, 1643–1649.
- Bronzoni, R.V.M., Baleotti, F.G., Nogueira, R.M.R. *et al.* (2005) Duplex Reverse Transcription-PCR followed by Nested PCR assays for detection and identification of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**, 696–702.
- Linnen, J.M., Vinelli, E., Sabino, E.C. *et al.* (2008) Dengue viremia in blood donors from Honduras, Brazil, and Australia. *Transfusion*, **48**, 1355–1362.
- Mohammed, H., Linnen, J.M., Muñoz-Jordán, J.L. *et al.* (2008) Dengue virus in blood donations, Puerto Rico, 2005. *Transfusion*, **48**, 1348–1354.
- Ooi, E.E., Goh, K.T. & Gubler, D.J. (2006) Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. *Emerging Infectious Diseases*, **12**, 887–893.
- Rothman, A.L. (2004). Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *Journal of Clinical Investigation*, **113**, 946–951.
- Teo, D., Ng, L.C. & Lam, S. (2009) Is dengue a threat to the blood supply? *Transfusion Medicine*, **19**, 66–77.
- Vasconcelos, P.F. (1992) Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazônia. *Ciência e Cultura*, **44**, 117–124.