

Recomendações do Grupo de Trabalho de especialistas para subsidiar a inclusão de método PanFlav de rastreamento de dengue vírus e demais flavivírus de importância médica em doadores de sangue no Brasil



Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz

Camila Amormino Corsini
Jaqueline Germano de Oliveira
Laura Alves Ribeiro Oliveira
Pedro Augusto Alves
Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz

International Society of Blood Transfusion – ISBT

José Eduardo Levi

Sociedade Brasileira de Imunizações – SBIM

Mônica Levi
Renato de Ávila Kfourri

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

Segunda Diretoria
Gerência-Geral de Produtos Biológicos, Radiofármacos, Sangue, Tecidos, Células, Órgãos e Produtos de Terapias Avançadas (GGBIO)
Gerência de Sangue, Tecidos, Células, Órgãos e Produtos de Terapias Avançadas (GSTCO) - João Batista Silva Júnior

Outubro de 2024

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	2
CONTEXTUALIZAÇÃO SOBRE OS FLAVIVÍRUS NO BRASIL	3
RELEVÂNCIA DA TRIAGEM MOLECULAR DE FLAVIVÍRUS EM DOADORES DE SANGUE.....	7
CASOS DOCUMENTADOS DE TRANSMISSÃO DE FLAVIVÍRUS POR TRANSFUSÃO SANGUÍNEA.....	8
NECESSIDADE DE TRIAGEM MOLECULAR PARA FLAVIVÍRUS EM DOADORES DE SANGUE.....	11
LIMITAÇÕES DOS MÉTODOS CONVENCIONAIS NA TRIAGEM DE FLAVIVÍRUS	12
DESCRIÇÃO DO MÉTODO PANFLAV	13
CONSIDERAÇÕES REGULAMENTARES E DE SAÚDE PÚBLICA	14
RECOMENDAÇÕES FINAIS.....	16
REFERÊNCIAS	17

APRESENTAÇÃO

Este documento foi elaborado por um grupo de trabalho composto por especialistas da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Sociedade Brasileira de Imunizações (SBIIm), *International Society of Blood Transfusion* (ISBT) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com o objetivo principal de subsidiar o Ministério da Saúde na inclusão da plataforma molecular PanFlav, baseada na tecnologia de PCR em tempo real, para o rastreamento de flavivírus de relevância médica que circulam no Brasil em amostras de doadores de sangue.

É, portanto, de extrema importância que a triagem para a identificação da presença de flavivírus, como o vírus da dengue, Zika vírus, vírus da febre amarela, vírus *West Nile* e vírus da encefalite de *Saint Louis*, seja realizada em doadores de sangue, assegurando a qualidade e segurança de hemocomponentes para a população brasileira.

Destacamos ainda que a plataforma PanFlav pode eventualmente ser adaptada para detectar os vírus recombinantes atenuados dos sorotipos 1 a 4 do dengue, que compõem as vacinas tetravalentes Qdenga (Takeda Pharma) e Butantan-DV (Instituto Butantan). Da mesma forma, pode ser expandida para outros arbovírus.

CONTEXTUALIZAÇÃO SOBRE OS FLAVIVÍRUS NO BRASIL

Os flavivírus são vírus com genoma RNA e grande plasticidade genética e alta frequência de mutações, o que permite adaptações em hospedeiros. É um grupo de vírus de importância significativa para a saúde pública no Brasil, pois inclui patógenos responsáveis por doenças endêmicas e epidêmicas. Essas doenças representam um grande desafio para o sistema de saúde brasileiro devido à sua alta incidência e potencial epidêmico. A transmissão ocorre principalmente por meio dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, que são amplamente distribuídos em áreas tropicais e subtropicais. Estudos recentes destacam a complexidade da interação entre esses vírus e seus vetores, bem como a influência de fatores ambientais e socioeconômicos na dinâmica das epidemias (FIGUEIREDO, 2007; DE AZEVEDO et al., 2020). No Brasil, fatores como a população estimada em 2024 de 212,6 milhões de habitantes e a extensão territorial de 8.510.000 km², sendo a maior proporção da cobertura com florestas tropicais e ecossistemas naturais com a presença de flora e fauna extremamente diversas, resultam em condições ideais para a existência de arboviroses que atingem nossa população, e a infestação de mosquitos altamente antropofílicos traz ao país um cenário epidemiológico de aumento de zoonoses de difícil controle.

Os flavivírus transmitidos por mosquitos e com relevância médica são motivo de grande preocupação devido ao número elevado de infectados sintomáticos, com altas taxas de complicações e de óbito. Em destaque encontram-se dengue vírus sorotipos 1, 2, 3 e 4 (DENV1-4), Zika vírus (ZIKV), vírus da febre amarela (FA), entre outros, que possuem ampla circulação no Brasil (FIGUEIREDO, 2000).

A dengue é uma das doenças de maior impacto no país. O Brasil enfrenta epidemias recorrentes da doença desde a década de 1980, com aumento significativo na incidência e na severidade dos casos ao longo dos anos. Os quatro sorotipos do DENV em circulação no Brasil são DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Todos eles são transmitidos pelo *Aedes aegypti* e apresentam diferenças antigênicas. Podem causar infecção assintomática, quadros leves e autolimitados e até quadros muito graves, como a febre hemorrágica e síndrome do choque da dengue (PAHO, 2024). A infecção por qualquer um dos sorotipos provoca uma resposta imune que oferece imunidade duradoura contra o mesmo sorotipo, mas não confere proteção completa contra os outros. Pelo contrário, a infecção subsequente por um sorotipo diferente está associada a um risco maior de desenvolver

formas graves da doença, devido a um fenômeno conhecido como *Antibody-dependent enhancement* (ADE), que possui associação com aumento da viremia (MARTINA et al., 2009). Clinicamente, os quatro sorotipos podem apresentar sintomas semelhantes, sendo os mais comuns: febre alta, mal-estar, dores musculares e articulares, dor retro ocular, erupção cutânea e cefaleia intensa. A evolução e a gravidade dependerão da virulência do sorotipo e da resposta imunológica do indivíduo (GUZMAN & HARRIS, 2015; KOK et al., 2023).

A dengue, inicialmente relatada na América do Sul em 1981 com os sorotipos DENV1 e DENV4, teve um surto significativo no Brasil nos anos 1990 com mais de 100 mil pessoas infectadas pelo DENV-2. Entre 1998 e 2003, DENV-1 e DENV-3 predominaram na região Norte, enquanto o sorotipo DENV-4 emergiu entre 2010 e 2011, com casos de infecções simultâneas. O DENV é hiper endêmico e apresenta incidências variadas em todo o país. Até a semana epidemiológica 52 de 2023, o Ministério da Saúde contabilizou 1.658.816 de casos prováveis, enquanto em todo ano de 2021 e 2022 foram contabilizados 531.922 e 1.420.259 casos prováveis, respectivamente (BRASIL, 2024a). Neste ano de 2024, o Brasil apresentou o maior número de casos desde o início da série histórica, sendo registrados 6.383.823 casos prováveis e 5.362 óbitos, permanecendo em investigação 1.796, até dia 24/09/2024 (BRASIL, 2024b).

O ZIKV é endêmico nas Américas e igualmente transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti*. A epidemia brasileira de Zika ocorreu nos anos de 2015-2016, como um episódio curto, intenso e assustador. Registrou-se 200 mil casos de infecção, rapidamente se espalhando para outros países das Américas e gerando um alerta de saúde pública, especialmente devido à transmissão transplacentária do vírus, que demonstrou estar associada a casos de microcefalia e outras malformações congênitas em bebês (ANTONIOU et al., 2020). A maioria dos infectados apresenta quadro clínico leve ou até assintomático, sendo os sintomas mais comuns: febre, artralgia, exantema, conjuntivite, mialgia e prostração (PROENCA-MODENA et al., 2018). Complicações neurológicas foram registradas em adultos, especialmente a síndrome de Guillain-Barré, causando sintomas de fraqueza muscular e paralisia.

A Síndrome Congênita do Zika destacou a vulnerabilidade da população e a necessidade de vigilância epidemiológica, controle de vetores e desenvolvimento de vacinas. O surto de ZIKV no Brasil expôs desafios na infraestrutura de saúde pública e na resposta a

emergências de saúde global, levando a uma mobilização internacional para investigar e mitigar os impactos do vírus (HEYMANN et al., 2016; BAUD et al., 2017). Em fevereiro de 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a microcefalia relacionada ao ZIKV como uma emergência de saúde pública de importância internacional.

A FA é uma infecção febril aguda, imunoprevenível, de início abrupto e gravidade variável, com letalidade elevada nos pacientes que evoluem com sintomas graves. A transmissão do vírus se dá pela picada de mosquitos dos gêneros *Aedes* (febre amarela urbana) e *Haemagogus* ou *Sabethes* (febre amarela de forma silvestre). No Brasil, o ciclo da doença atualmente é o silvestre, sendo que os últimos casos de febre amarela urbana foram registrados no país em 1942. No ciclo silvestre, os primatas não humanos são considerados os principais hospedeiros, amplificadores do vírus, e são vítimas da doença assim como o ser humano, que, nesse ciclo, apresenta-se como hospedeiro acidental.

Durante a viremia, pessoas infectadas contribuem para transmissão viral através da picada do mosquito que é responsável pelo aumento de casos. Estima-se que, a cada 200 mil casos, ocorram cerca de 30 mil mortes (GIANCHECCHI et al., 2022). No país, há uma preocupação de saúde pública recorrente, especialmente em áreas rurais e silvestres endêmicas. Os sintomas da febre amarela incluem febre súbita, calafrios, dor de cabeça, dores no corpo, náuseas, vômitos, fadiga, e fraqueza. Nas formas graves, o paciente pode apresentar hepatite com icterícia, insuficiência renal, hemorragia e, em alguns casos, choque e morte (MONATH & VASCONCELOS, 2015). Além disso, a doença apresenta estágios distintos, começando com a fase de viremia, seguida por uma remissão acompanhada de soroconversão e variações nos sintomas. Em alguns casos, evolui para uma fase de intoxicação, caracterizada pelo aparecimento de sintomas graves, como febre hemorrágica, que acomete cerca de 25% dos pacientes sintomáticos (LITVOC et al., 2018). A FA está atualmente controlada graças à vacinação em massa, com surtos entre 2016 e 2017 que levou ao aumento da vigilância e busca por aumento da cobertura vacinal.

Nas últimas décadas, diversas reemergências do vírus da FA foram registradas na região extra-amazônica, com destaque para a mais recente, iniciada em 2014. Este surto se transformou no maior do último século, afetando uma vasta área e resultando em um prolongado período de transmissão, que se estende até os dias de hoje. A disseminação do vírus, que se expandiu do Centro-Oeste até o extremo leste do Brasil, incluiu regiões

onde a FA nunca havia sido anteriormente registrada, e nessas áreas a vacinação não era, até então, recomendada. Essa expansão territorial levou a mudanças nas recomendações de vacinação pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI), sendo incluída como rotina para todos os brasileiros a partir de 9 meses de vida. Milhares de casos e centenas de mortes ocorreram apenas na última década, com letalidade de 34,3% (BRASIL, 2024c). Nos últimos seis meses, quatro casos de FA foram registrados no Brasil: um em Roraima, um no Amazonas e dois em São Paulo. Três desses pacientes foram a óbito (BRASIL, 2024d).

A febre do *West Nile* é uma infecção viral aguda transmitida principalmente por mosquitos do gênero *Culex*. A doença pode variar de formas assintomáticas até quadros graves. Usualmente apresenta-se com sintomas leves como febre, mal-estar e fraqueza. Nos quadros mais graves, com acometimento do sistema nervoso central, os pacientes podem apresentar quadros de meningite, encefalite ou paralisia flácida aguda. A transmissão ocorre através da picada de mosquitos infectados, tendo aves silvestres como hospedeiros naturais. Não há vacina ou tratamento antiviral específico, sendo o tratamento focado em cuidados de suporte. Casos graves podem necessitar de hospitalização e cuidados intensivos (HABARUGIRA et al., 2020).

O Ministério da Saúde está monitorando o avanço da doença causada pelo vírus Oropouche, que já contabilizou 8.174 casos no Brasil até 24 de setembro deste ano. O vírus, transmitido pelo inseto *Culicoides paraensis* (conhecido como maruim), provoca sintomas semelhantes aos da dengue, como febre, dor de cabeça e dor muscular. Sem tratamento específico ou vacina disponível, a doença pode causar complicações neurológicas e, em casos raros, ser fatal. Ações de testagem e vigilância em todo o país forma intensificadas, especialmente em regiões com maiores surtos (BRASIL, 2024a; ZHANG et al., 2024).

O vírus da encefalite de *Saint Louis* é transmitido por mosquitos do gênero *Culex*. Os sintomas podem variar de leves, como febre e dor de cabeça, a graves, incluindo meningite e encefalite, com maior incidência de casos graves entre idosos. No Brasil, o vírus foi isolado pela primeira vez em 2004 em um paciente que apresentou fortes dores de cabeça e suspeita de dengue. Há também registros raros de coinfeções com outros sorotipos do vírus da dengue (DENV) (LOPES et al., 2014).

RELEVÂNCIA DA TRIAGEM MOLECULAR DE FLAVIVÍRUS EM DOADORES DE SANGUE

Nos últimos anos, o aumento dos casos das infecções por flavivírus no Brasil despertou a preocupação das agências sanitárias quanto à possibilidade de transmissão de flavivírus através de transfusões de sangue, especialmente de doadores infectados ou portadores do vírus. A ocorrência de alguns casos elevou a vigilância epidemiológica nos hemocentros, pois esses vírus podem estar presentes no sangue de indivíduos assintomáticos ou durante a fase de viremia. Isso gerou uma crescente preocupação com a segurança do sangue coletado em regiões endêmicas (LEVI, 2018). A transfusão de sangue contaminado pode resultar na transmissão dos vírus para os receptores, que podem desenvolver formas graves da doença. Esse risco acentua a necessidade de testes rigorosos e protocolos de triagem para doadores de sangue em áreas endêmicas, além de estratégias para minimizar a transmissão, como o uso de testes de amplificação de ácido nucleico (NAT) para detectar a presença de flavivírus no sangue doado (FADDY et al., 2019).

A transfusão de sangue é uma prática médica essencial, desempenhando um papel crucial no tratamento de diversas condições clínicas, desde emergências traumáticas até tratamentos de doenças crônicas e procedimentos cirúrgicos complexos. Os receptores de sangue frequentemente enfrentam situações como hemorragias graves, anemia severa, leucemias e doenças hemorrágicas, sendo a transfusão uma ferramenta indispensável em terapias para câncer. A disponibilidade de sangue seguro e compatível é fundamental para o sucesso dos tratamentos e para que vidas sejam salvas em situações críticas (STORCH et al., 2019; YADAV et al., 2024).

Apesar dos indiscutíveis benefícios, a transfusão de sangue apresenta desafios complexos, especialmente em relação à segurança do receptor, pois o sangue pode servir como um veículo para a transmissão de infecções (OBEAGU et al., 2024).

Neste contexto, para garantir a segurança dos pacientes receptores de sangue, é essencial implementar processos rigorosos de triagem e testes dos doadores. Campanhas de doação, educação pública e pesquisa contínua são fundamentais para assegurar a disponibilidade de sangue seguro e minimizar riscos. O monitoramento de reações adversas e a gestão eficaz dos sistemas de rastreamento são igualmente cruciais para manter a eficácia e a segurança do sistema de transfusão. A pesquisa contínua e a inovação são indispensáveis

para aprimorar as práticas transfusionais e enfrentar novos desafios, como o surgimento de novos patógenos e a necessidade de métodos de triagem mais avançados e eficazes.

CASOS DOCUMENTADOS DE TRANSMISSÃO DE FLAVIVÍRUS POR TRANSFUSÃO SANGUÍNEA

A questão do risco transfusional de flavivírus só entrou na pauta da Hemoterapia a partir da introdução do vírus *West Nile* (WNV) nos Estados Unidos, no final do milênio passado. Foi o primeiro registro deste agente no hemisfério ocidental e resultou em uma grande epidemia entre pessoas e aves daquele país (NASH et al., 2001). Cerca de dois anos após este evento, foram identificados *clusters* de transmissão de WNV em receptores de transplante de órgãos. A investigação destes casos levou a conclusão da transmissão transfusional deste flavivírus e outros casos transfusionais com repercussão clínica evidente foram reportados (PEALER et al., 2003). Imediatamente, houve uma mobilização do *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), de agências de fomento, serviços de sangue e empresas no sentido de desenvolver um teste que pudesse mitigar este risco de transmissão transfusional (DODD, 2015).

Como o WNV e os flavivírus em geral apresentam um curto período de viremia, de cerca de uma semana, que precede o desenvolvimento de anticorpos, era natural que este teste, necessariamente, deveria detectar o RNA viral. Coincidentemente, naquele momento, o teste NAT havia sido implantado em todos os serviços transfusionais americanos, visando cobrir o período de janela imunológica dos vírus da hepatite C (HCV) e da imunodeficiência humana (HIV). Assim, as empresas produtoras do NAT rapidamente desenvolveram os reagentes para mais este alvo molecular. O NAT para WNV foi implementado em 2003 e segue sendo obrigatório nos Estados Unidos e no Canadá, sendo posteriormente adotado em pequenos surtos na Europa.

Por motivos ainda desconhecidos, o WNV nunca chegou aos humanos na América do Sul (LORENZ & CHIARAVALLI-NETO, 2022). No entanto, sabemos que nosso continente, especialmente o Brasil, abriga várias espécies endêmicas de flavivírus patogênicos ao homem (MARCONDES et al., 2017).

Vários estudos retrospectivos mostram que doadores de sangue, cujas doações foram aceitas para transfusão, estavam virêmicos no momento da doação (CUSTER et al., 2023).

Estudos de amostras provenientes de doadores de sangue de vários países endêmicos para dengue, a partir de análises de testes moleculares, documentaram taxas de viremia de até 0,4% durante surtos nestas localidades, fator preocupante que deve ser constantemente monitorado para a contingência e controle desta doença (LINNEN et al., 2008; MOHAMMED et al., 2008; DIAS et al., 2012; STRAMER et al., 2012).

Em momentos de pico das epidemias de dengue, até 2% dos doadores estão virêmicos em capitais brasileiras como Rio de Janeiro e Recife (SABINO et al., 2016), e taxas até maiores foram observadas para doadores com Zika vírus na região de Ribeirão Preto (SLAVOV et al., 2017).

Estes percentuais contrastam fortemente com o reduzido número de casos na literatura de transmissão transfusional de algum destes flavivírus, principalmente da dengue, a mais incidente dentre as citadas acima. Embora algumas hipóteses tenham sido sugeridas para esta discrepância (LEVI, 2016), a subnotificação de casos de dengue transmitida via transfusional no Brasil tem levado à crença de que intervenções adicionais para garantir a segurança transfusional não seriam necessárias. No entanto, ainda que escassos, os casos existem e em alguns deles observaram-se quadros de dengue com sinais de alarme nos receptores, sendo fundamental implementar medidas que aumentem a segurança (TAMBYAH et al., 2008; SANTOS et al., 2020). Alguns estudos relataram evidências de que indivíduos receptores de transfusões apresentaram sintomas compatíveis com os da dengue, com detecção de níveis de anticorpos de fase aguda (IgM) específicos para os sorotipos, meses após a transfusão (POZZETTO et al., 2015).

Uma excelente revisão recente compilou 74 casos publicados de transmissão transfusional de arbovírus nos últimos 20 anos, envolvendo 10 arbovírus distintos. Chama a atenção que dos 74 casos, tem-se 72 associados ao gênero flavivírus, inclusive com 3 casos de transmissão do vírus vacinal da FA (GIMÉNEZ-RICHARTE et al., 2022).

As preocupações com a possível transmissão da dengue e outros flavivírus por transfusão se intensificaram após os primeiros relatos da transmissão transfusional de DENV serem publicados em 2002 em três receptores em Hong Kong e, em 2008, em dois receptores em Singapura (CHUANG et al., 2008; TAMBYAH et al., 2008). Além disso, um caso de dengue hemorrágica em um receptor de uma transfusão positiva para RNA de DENV foi identificado por meio de um estudo retrospectivo em Porto Rico em 2007 (STRAMER et

al., 2012). Mais recentemente, três casos de infecção por DENV a partir de transmissão transfusional em receptores de sangue foram descritos no Brasil e em Singapura (LEVI et al., 2015; OH et al., 2015; SANTOS, 2020).

Aproximadamente 60-80% dos infectados com DENV são assintomáticos ou têm infecções subclínicas. As razões para a ocorrência da transmissão transfusional de uma infecção comum como a dengue pode incluir a falta de vigilância ativa durante grandes epidemias de arbovírus, a possível atenuação dos sintomas pela presença de anticorpos pré-existentes contra o DENV, além da diminuição dos sintomas clínicos em receptores de transfusão devido à imunossupressão causada por doenças subjacentes (TEO et al., 2009; WILDER-SMITH et al., 2009; PETERSEN & BUSCH, 2010).

Entre fevereiro e junho de 2012, amostras foram coletadas de doadores e receptores de sangue. Essas amostras foram testadas retrospectivamente para RNA de DENV por amplificação mediada por transcrição. Foi realizada uma revisão dos prontuários dos receptores, utilizando um design de caso-controle (positivo e negativo para DENV), para a avaliação dos sintomas (SABINO et al., 2016). Dos 39.134 doadores de sangue recrutados neste estudo, a viremia por DENV-4 foi confirmada em 0,51% das doações de indivíduos no Rio de Janeiro e em 0,80% dos indivíduos em Recife. No total, 42 unidades positivas para RNA de DENV foram transfundidas em 35 receptores. Destas, 16 unidades positivas para RNA transfundidas em 16 receptores suscetíveis foram identificadas como: cinco casos considerados prováveis de transmissão transfusional, um caso possível e dez casos sem transmissão. A taxa de transmissão transfusional foi de 37,5%, significativamente maior do que a taxa de viremia de 0,93% em receptores não expostos. Este estudo identificou que mais de 0,5% das doações foram positivas para RNA viral, e aproximadamente um terço dos componentes resultaram em transmissão transfusional.

Esses dados são um indicador preocupante da capacidade de transmissão do DENV através de transfusões de sangue (SABINO et al., 2016) e ressaltam a importância do monitoramento contínuo e da introdução de medidas de controle mais rigorosas para a prevenção da disseminação de flavivírus, especialmente em contextos de grandes surtos epidêmicos.

NECESSIDADE DE TRIAGEM MOLECULAR PARA FLAVIVÍRUS EM DOADORES DE SANGUE

Embora a triagem molecular para flavivírus de doadores ainda não seja uma prática adotada no Brasil, outros países já lançaram mão desta medida. Portugal, Porto Rico e Polinésia Francesa introduziram o método NAT para dengue em períodos epidêmicos. Mais recentemente, o banco de sangue da Catalunha (Espanha) também passou a realizar a triagem para dengue vírus, Zika vírus e chikungunya após casos autóctones de DENV no verão de 2023 na região.

Pelo baixo número de casos relatados com impacto clínico no receptor, fica complexa a realização de estudos de custo-efetividade, um aspecto importante a ser considerado antes da tomada de decisão de implantação. Cabe ressaltar que, financeiramente, o NAT com os alvos tradicionais HBV, HCV e HIV não é custo-efetivo, mas ainda assim é um padrão adotado internacionalmente em dezenas de países, incluindo o Brasil. No entanto, ao invés de utilizar um teste NAT que cubra apenas os quatro sorotipos de DENV, o uso de iniciadores (*primers*) e sondas (*probes*) genéricos para flavivírus de relevância médica em um único teste irá aumentar significativamente a eficácia do diagnóstico. Esse teste, que ainda não existe em qualquer serviço de triagem de sangue do mundo, terá uma importância não apenas para o Brasil, mas também para outros países da região com circulação potencial ou existente dos mesmos agentes, ao incluir ao menos a detecção de DENV1-4, ZIKV, vírus da FA, WNV e vírus da encefalite de *Saint Louis*.

A partir das evidências de transmissão transfusional de flavivírus, como o DENV, torna-se imprescindível a implementação de triagens rigorosas em doadores de sangue, especialmente em regiões endêmicas como o Brasil. A identificação precoce de doadores com viremia é essencial para reduzir o risco de transmissão do DENV por transfusão, protegendo, assim, a saúde dos receptores e evitando surtos associados a infecções por flavivírus. A adoção de testes moleculares sensíveis para a detecção do RNA viral pode ajudar a minimizar esses riscos e garantir a segurança transfusional (COSTA-LIMA et al., 2021).

Além disso, uma triagem eficaz para flavivírus em doadores de sangue aumentará a confiança dos pacientes e da sociedade nas práticas de transfusão, assegurando que o sangue doado esteja seguro e livre de patógenos infecciosos. Adicionalmente, esta triagem mais robusta pode contribuir para a vigilância epidemiológica, colaborando no

monitoramento da prevalência de infecções virais na população e a na orientação de políticas em saúde pública (COSTA-LIMA et al., 2021).

LIMITAÇÕES DOS MÉTODOS CONVENCIONAIS NA TRIAGEM DE FLAVIVÍRUS

Nenhum método específico de triagem para flavivírus é utilizado hoje em triagem laboratorial de doadores no Brasil. Indiretamente, a temperatura corporal é monitorada e são feitas perguntas sobre o estado geral do doador, procedimentos que são aplicáveis a todas as infecções. Para evitar a transmissão transfusional de vírus vacinal atenuado, é verificado o histórico de vacinação. Doadores que foram imunizados com vacinas vivas atenuadas, como aquelas para FA, sarampo, caxumba e rubéola (SCR), varicela e dengue, são temporariamente inabilitados para doação por um período de quatro semanas.

A Nota Técnica Nº 5/2020-CGSH/DAET/SAES/MS destaca a importância da triagem clínica e epidemiológica dos candidatos à doação de sangue, considerando, por exemplo, o histórico de doenças infecciosas, como dengue e Zika, e o contato com pessoas infectadas (Ministério da Saúde. Nota Técnica Nº 5/2020- CGSH/DAET/SAES/MS). Esses critérios de inaptidão à doação são utilizados para reduzir o risco de transmissão transfusional de infecções, sendo ajustados conforme a prevalência epidemiológica local e as evidências científicas disponíveis. No entanto, em situações assintomáticas, somente a triagem clínica e epidemiológica pode ser insuficiente, o que reforça a necessidade de ampliar os mecanismos de complementação com testes laboratoriais. Esses testes são essenciais para garantir maior segurança no diagnóstico de potenciais riscos, especialmente em candidatos que não apresentam sintomas evidentes.

Juntamente, a Nota Técnica Nº 5/2024/SEI/GSTCO/GGBIO/DIRE2/ANVISA aborda critérios técnicos para a triagem clínica de candidatos à doação de sangue e hemocomponentes, levando em consideração a infecção por dengue e as recomendações em relação à vacinação e ao uso de hemocomponentes e imunoglobulinas (ANVISA. Nota Técnica Nº 5/2024/SEI/GSTCO/GGBIO/DIRE2/ANVISA). No contexto do aumento de casos de dengue e o início da vacinação no Brasil neste ano, orientações detalhadas foram fornecidas para a triagem clínica, como a inaptidão temporária de candidatos infectados pelo vírus da dengue, aqueles com contato sexual com infectados, e vacinados contra a dengue. Critérios que são fundamentais para a triagem clínica e

epidemiológica, visando reduzir os riscos transfusionais associados ao DENV. No entanto, em casos assintomáticos ou de infecções subclínicas, onde a triagem clínica e epidemiológica pode não detectar potenciais infecções, é essencial incluir triagem por teste molecular, de forma a garantir a segurança na seleção de doadores e, consequentemente, na proteção dos receptores de sangue e hemocomponentes.

Se por um lado, testes moleculares proporcionam uma detecção precisa e confiável das infecções, os métodos convencionais para diagnóstico de dengue, como a detecção do antígeno NS1 e dos anticorpos IgM e IgG, apresentam limitações significativas de sensibilidade, que também se refletem na triagem de doadores de sangue e no diagnóstico de outros arbovírus. Esses testes frequentemente falham em identificar infecções em estágios iniciais ou subclínicos, o que pode resultar em uma menor acurácia na detecção de doenças como Zika, FA e outros flavivírus. Essa deficiência na sensibilidade pode levar à subnotificação de casos e à falha na identificação de infecções atípicas ou assintomáticas, comprometendo a eficácia das estratégias de vigilância e controle (Ministério da Saúde. Nota Técnica Nº 16/2024-CGLAB/SVSA/MS).

Pelo exposto, a detecção do RNA viral por técnicas de amplificação molecular, como a PCR, oferece uma sensibilidade muito maior e é capaz de identificar diversos arbovírus simultaneamente. Este método permite uma triagem mais eficaz e reduz o risco de transmissão de patógenos, como dos flavivírus aqui apresentados. Portanto, a inclusão de testes moleculares na triagem de doadores e na rotina diagnóstica é estratégia crucial para garantir a segurança transfusional, em complementação a triagem clínica e epidemiológica.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO PANFLAV

Atualmente, não existe um método PanFlav completo disponível para uso diagnóstico no Brasil. Para suprir essa necessidade, a Fiocruz desenvolveu e validou uma metodologia multiplex baseada em PCR em tempo real, reconhecendo a importância crítica de um teste capaz de detectar simultaneamente múltiplos flavivírus em amostras de sangue. Este método é fundamental não apenas para a triagem de doadores de sangue, mas também para melhorar a vigilância epidemiológica e o controle de surtos de doenças, como dengue, Zika e FA.

A metodologia desenvolvida pela Fiocruz foi projetada para integração com a plataforma e produto NAT-Plus brasileiro. A técnica amplifica fragmentos genômicos e detecta produtos diretamente na plataforma de instrumentação utilizando marcadores sensíveis de medição da fluorescência. Pela análise de amostras de sangue, o ensaio inclui a detecção dos flavivírus de interesse epidemiológico, como os quatro sorotipos de dengue vírus (DENV1-4), ZKV, vírus da FA, WNV e vírus da encefalite de *Saint Louis*, utilizando alvos altamente conservados. Durante a fase exponencial da amplificação, a quantidade de alvo na reação é determinada por comparação com uma curva padrão, e o ciclo de reação necessário para atingir o limiar de fluorescência (*cycle threshold*, Ct) é inversamente proporcional à quantidade inicial do alvo. Este método passou por uma rigorosa validação para garantir sua eficácia e robustez na identificação viral, não tendo sido ainda submetido ao registro sanitário na ANVISA.

CONSIDERAÇÕES REGULAMENTARES E DE SAÚDE PÚBLICA

O desenvolvimento de métodos de diagnóstico para a detecção de ácidos nucleicos de arbovírus tem se tornado um ponto crucial na segurança transfusional e nas práticas de doação de sangue no Brasil. Esses métodos têm papel fundamental na identificação precoce de infecções e na prevenção da transmissão dessas doenças por transfusão sanguínea, uma questão de extrema relevância na saúde pública brasileira, dada a alta prevalência dessas arboviroses em diversas regiões do país.

A cada doação de sangue, é mandatório realizar testes laboratoriais de alta sensibilidade para detecção de marcadores de algumas doenças infecciosas transmissíveis pelo sangue, conforme diretrizes do Ministério da Saúde, não tendo sido ainda incluídos os flavivírus. A ANVISA segue as diretrizes internacionais, como as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), que enfatizam a necessidade de métodos diagnósticos eficientes para triagem laboratorial aplicada a doação e transfusão de sangue.

Os reagentes utilizados devem estar registrados ou autorizados pela ANVISA, e os testes devem seguir estritamente as instruções dos fabricantes, em processos de trabalho definidos, utilizando reagentes validados para triagem de doadores. Produtos para diagnóstico *in vitro*, regulamentados pela agência, incluem reagentes, calibradores, controles, coletores de amostras e outros instrumentos destinados à análise de amostras

humanas, com a finalidade de diagnóstico clínico, triagem de doadores, compatibilidade para transfusões e transplantes, dentre outras.

Os critérios para a classificação desses produtos de diagnóstico *in vitro* consideram:

1. A indicação de uso pelo fabricante;
2. O conhecimento técnico-científico desenvolvido;
3. A importância diagnóstica da informação gerada;
4. O impacto dos resultados para a saúde pública;
5. A relevância epidemiológica.

De acordo com a Lei nº 6.360/1976 e a Lei nº 9.782/1999, produtos de diagnóstico *in vitro* só podem ser comercializados após o registro na ANVISA, seguindo rigorosos padrões de qualidade, segurança e eficácia. O fabricante deve submeter documentação técnica completa, incluindo detalhes sobre o produto, instruções de uso e validação metodológica, assegurando a sensibilidade e especificidade dos resultados.

No caso de kits como o método PanFlav de Bio-Manguinhos/Fiocruz que utiliza tecnologia para detecção de ácidos nucleicos de dengue vírus, ZKV, vírus da FA, WNV e vírus da encefalite de *Saint Louis*, o registro sanitário irá incluir validação rigorosa e estudos de performance permitindo a identificação de patógenos em fases iniciais da infecção, mesmo antes da manifestação clínica dos sintomas, para garantir a eficácia em condições reais de uso, protegendo tanto doadores quanto receptores de sangue. Essa antecipação é essencial para reduzir os riscos de transmissão transfusional, já que muitas dessas infecções podem ser assintomáticas ou subclínicas nos doadores e não serem captadas na fase de triagem clínica e epidemiológica.

As arboviroses constituem um dos maiores desafios de saúde pública no Brasil, representando não apenas um impacto direto sobre a população, mas também sobre os serviços de saúde e a economia. Kits de diagnóstico de alta performance permitem uma triagem mais segura dos doadores, contribuindo para a redução da incidência de infecções transmitidas por transfusão.

RECOMENDAÇÕES FINAIS

Tendo como referência as informações contidas neste documento e, ainda, a Nota Informativa Conjunta Nº 2/2024 - DEDT/DPNI/DEMSP e a Nota Técnica Nº 16/2024-CGLAB/SVSA/MS, o Grupo de Trabalho (GT) recomenda ao Ministério da Saúde a incorporação da plataforma molecular PanFlav, baseada na tecnologia de PCR em tempo real, para a triagem obrigatória de doadores de sangue.

A triagem laboratorial para a identificação de flavivírus, incluindo os quatro sorotipos do dengue vírus, Zika vírus, vírus da febre amarela, vírus *West Nile* e vírus da encefalite de *Saint Louis*, é crucial para garantir a qualidade e a segurança do sangue coletado e disponibilizado em bolsas de sangue pelos hemocentros.

A implementação deste método de triagem atenderá não apenas à necessidade de proteger os receptores de sangue contra possíveis infecções transfusionais, mas também contribuirá para a vigilância epidemiológica e o monitoramento da prevalência de flavivírus no Brasil. Além disso, a adaptação da plataforma PanFlav para detectar os vírus recombinantes das vacinas tetravalentes de dengue representa um benefício adicional, garantindo a segurança em contextos de vacinação.

Portanto, recomenda-se a adoção da triagem laboratorial molecular PanFlav obrigatória como um padrão para a triagem de doadores de sangue, em adição a triagem clínica e epidemiológica, visando proteger a saúde pública e aumentar a confiança na segurança das transfusões de sangue no país.

REFERÊNCIAS

ANTONIOU E, OROVOU E, SARELLA A, ILIADOU M, RIGAS N, PALASKA E, IATRAKIS G, DAGLA M. Zika Virus and the Risk of Developing Microcephaly in Infants: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 May 27;17(11):3806.

ANVISA. Nota Técnica N° 5/2024/SEI/GSTCO/GGBIO/DIRE2/ANVISA. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/sangue-tecidos-celulas-e-orgaos/notas-tecnicas/vigentes/nota-tecnica-conjunta-ndeg-05-de-2020.pdf/view>.

BAUD D, GUBLER DJ, SCHAUB B, LANTERI MC, MUSSO D. An update on Zika virus infection. *Lancet*. 2017 Nov 4;390(10107):2099-2109.

BRASIL. 2024a. Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica. Casos prováveis de dengue. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dengue/situacao-epidemiologica>.

BRASIL. 2024b. Ministério da Saúde. Atualização de Casos de Arboviroses. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aedes-aegypti/monitoramento-das-arboviroses>.

BRASIL. 2024c. Ministério da Saúde. Ministério da Saúde pede atenção para vigilância e vacinação de febre amarela. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2024/abril/ministerio-da-saude-pede-atencao-para-vigilancia-e-vacinacao-de-febre-amarela>.

BRASIL. 2024d. Ministério da Saúde. NOTA INFORMATIVA CONJUNTA N° 2/2024/DEDT/DPNI/DEMSP. Alerta para intensificação das ações de vigilância e imunização nas áreas com transmissão ativa do vírus da febre amarela. p. 1-6.

CHUANG V, WONG TY, LEUNG YH, MA E, LAW YL, TSANG O, CHAN KM, TSANG I, QUE TL, YUNG R, LIU SH. Review of dengue fever cases in Hong Kong during 1998 to 2005. *Hong Kong Med J*. 2008 Jun;14(3):170-7.

COSTA-LIMA C, BENITES BD, ROCHA DR, ANDRADE E, ALVAREZ P, MAGNUS MM, ADDAS-CARVALHO M. Post donation information during dengue outbreaks at a single blood center in Brazil: An ally against transfusion-transmitted infections. *Asian J Transfus Sci*. 2021 Jan-Jun;15(1):82-86.

CUSTER B, GREBE E, BUCCHERI R, BAKKOUR S, STONE M, CAPUANI L, ALENCAR C, AMORIM L, LOUREIRO P, CARNEIRO-PROIETTI AB, MENDRONE-JUNIOR A, GONÇALEZ T, GAO K, LIVEZEY KW, LINNEN JM, BRAMBILLA D, MCCLURE C, BUSCH MP, SABINO EC; Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study (REDS-III) International Component Brazil. Surveillance for Zika, Chikungunya, and Dengue Virus Incidence and RNAemia in Blood Donors at 4 Brazilian Blood Centers During 2016-2019. *J Infect Dis*. 2023 Mar 1;227(5):696-707.

DE AZEVEDO TS, LORENZ C, CHIARAVALLOTI-NETO F. Spatiotemporal evolution of dengue outbreaks in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2020 Aug 1;114(8):593-602.

DIAS LL, AMARILLA AA, POLONI TR, COVAS DT, AQUINO VH, FIGUEIREDO LT. Detection of dengue virus in sera of Brazilian blood donors. *Transfusion.* 2012 Aug;52(8):1667-71.

DODD RY, FOSTER GA, STRAMER SL. Keeping Blood Transfusion Safe From West Nile Virus: American Red Cross Experience, 2003 to 2012. *Transfus Med Rev.* 2015 Jul;29(3):153-61.

FADDY HM, OSIOWY C, CUSTER B, BUSCH M, STRAMER SL, ADESINA O, VAN DE LAAR T, TSOI WC, STYLES C, KIELY P, MARGARITIS A, KWON SY, QIU Y, DENG X, LEWIN A, JØRGENSEN SW, ERIKSTRUP C, JUHL D, SAULEDA S, CAMACHO RODRIGUEZ BA, CORAL LJCS, GAVIRIA GARCÍA PA, OOTA S, O'BRIEN SF, WENDEL S, CASTRO E, NAVARRO PÉREZ L, HARVALA H, DAVISON K, REYNOLDS C, JARVIS L, GRABARCZYK P, KOPACZ A, ŁĘTOWSKA M, O'FLAHERTY N, YOUNG F, WILLIAMS P, BURKE L, CHUA SS, MUYLAERT A, PAGE I, JONES A, NIEDERHAUSER C, VERMEULEN M, LAPERCHE S, GALLIAN P, SAWADOGO S, SATAKE M, GHAREHBAGHIAN A, ADDAS-CARVALHO M, BLANCO S, GALLEGGO SV, SELTSAM A, WEBERSCHEHL M, AL-RIYAMI AZ, AL MAAMARI K, ALAWI FB, PANDEY HC, MBANYA D, FRANÇA RA, CHARLEWOOD R; Virology and Surveillance; Risk Assessment and Policy subgroups of the ISBT Working Party on Transfusion-transmitted Infectious Diseases. International review of blood donation nucleic acid amplification testing. *Vox Sang.* 2024 Apr;119(4):315-325.

FIGUEIREDO LT. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect.* 2000 Nov;2(13):1643-9.

FIGUEIREDO, L. T. M. J. R. D. S. B. D. M. T. Emergent arboviruses in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2007;40:224-229.

GIANCHECCHI E, CIANCHI V, TORELLI A, MONTOMOLI E. Yellow Fever: Origin, Epidemiology, Preventive Strategies and Future Prospects. *Vaccines (Basel).* 2022 Feb; 27;10(3):372.

GIMÉNEZ-RICHARTE A, et al. Transfusion-transmitted arboviruses: Update and systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2020;16(10):e0010843.

GUZMAN MG, HARRIS E. Dengue. *Lancet.* 2015 Jan 31;385(9966):453-65.

HABARUGIRA, G., SUEN, W. W., HOBSON-PETERS, J., HALL, R. A., BIELEFELDT-OHMANN, H. West Nile Virus: Na Update on Pathobiology, Epidemiology, Diagnostics, Control and “One Health” Implications. *Pathogens.* 2020;9(7):589.

HEYMANN DL, HODGSON A, SALL AA, FREEDMAN DO, STAPLES JE, ALTHABE F, BARUAH K, MAHMUD G, KANDUN N, VASCONCELOS PF, BINO S, MENON KU. Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC? *Lancet.* 2016 Feb 20;387(10020):719-21.

- KOK BH, LIM HT, LIM CP, LAI NS, LEOW CY, LEOW CH. Dengue virus infection - a review of pathogenesis, vaccines, diagnosis and therapy. *Virus Res.* 2023 Jan; 324:199018.
- LEVI JE, NISHIYA A, FÉLIX AC, SALLES NA, SAMPAIO LR, HANGAI F, SABINO EC, MENDRONE A JR. Real-time symptomatic case of transfusion-transmitted dengue. *Transfusion.* 2015 May;55(5):961-4.
- LEVI JE. Dengue Virus and Blood Transfusion. *Journal of Infectious Diseases.* 2016;213:689–90.
- LEVI JE. Emerging Infectious Agents and Blood Safety in Latin America. *Front Med (Lausanne).* 2018 Mar 14;5:71.
- LINNEN JM, VINELLI E, SABINO EC, TOBLER LH, HYLAND C, LEE TH, KOLK DP, BROULIK AS, COLLINS CS, LANCIOTTI RS, BUSCH MP. Dengue viremia in blood donors from Honduras, Brazil, and Australia. *Transfusion.* 2008 Jul;48(7):1355-62.
- LITVOC MN, NOVAES CTG, LOPES MIBF. Yellow fever. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 2018 Feb;64(2):106-113.
- LOPES N, NOZAWA C, LINHARES REC. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude.* 2014; 5(3):55-64.
- LORENZ C, CHIARAVALLOTI-NETO F. Why are there no human West Nile virus outbreaks in South America? *The Lancet Regional Health Americas.* 2022;19(12):100276.
- MARCONDES C.B, CONTIGIANI M, GLEISER R.M. Emergent and Reemergent Arboviruses in South America and the Caribbean: Why So Many and Why Now? *Journal of Medical Entomology,* 2017;54(3):509-532.
- MARTINA BE, KORAKA P, OSTERHAUS AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Oct;22(4):564-81.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. NOTA TÉCNICA Nº 5/2020- CGSH/DAET/SAES/MS. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2024/dengue-nota-tecnica-orienta-sobre-triagem-para-doacao-de-sangue>.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. NOTA TÉCNICA Nº 16/2024- CGLAB/DAET/SAES/MS. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/notas-tecnicas/2024/nota-tecnica-no-16-2024-cglab-svsa-ms>.
- MOHAMMED H, LINNEN JM, MUÑOZ-JORDÁN JL, TOMASHEK K, FOSTER G, BROULIK AS, PETERSEN L, STRAMER SL. Dengue virus in blood donations, Puerto Rico, 2005. *Transfusion.* 2008 Jul;48(7):1348-54.
- MONATH TP, VASCONCELOS PF. Yellow fever. *J Clin Virol.* 2015 Mar;64:160-73.
- NASH D, et al. The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *New England Journal.* 2001;344:1807-1814.

OBEAGU EI, ANYANWU CN, OBEAGU GU. Challenges and Considerations in Managing Blood Transfusion for Individuals with HIV. *Elite Journal of HIV*. 2024;2(2):1-17.

OH HB, MUTHU V, DARUWALLA ZJ, LEE SY, KOAY ES, TAMBYAH PA. Bitten by a bug or a bag? Transfusion-transmitted dengue: a rare complication in the bleeding surgical patient. *Transfusion*. 2015 Jul;55(7):1655-61.

PAHO. 2024. Dengue. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/dengue>.

PEALER, L. N. et al. Transmission of West Nile Virus through Blood Transfusion in the United States in 2002. *New England Journal Medicine*. 2003;349:1236–1245.

PETERSEN LR, BUSCH MP. Transfusion-transmitted arboviruses. *Vox Sang*. 2010 May;98(4):495-503.

POZZETTO B, MEMMI M, GARRAUD O. Is transfusion-transmitted dengue fever a potential public health threat? *World J Virol*. 2015 May 12;4(2):113-23.

PROENCA-MODENA JL, MILANEZ GP, COSTA ML, JUDICE CC, MARANHÃO COSTA FT. Zika virus: lessons learned in Brazil. *Microbes Infect*. 2018 Dec;20(11-12):661-669.

SABINO EC, LOUREIRO P, LOPES ME, CAPUANI L, MCCLURE C, CHOWDHURY D, DI-LORENZO-OLIVEIRA C, OLIVEIRA LC, LINNEN JM, LEE TH, GONÇALEZ T, BRAMBILLA D, KLEINMAN S, BUSCH MP, CUSTER B; International Component of the NHLBI Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study-III. Transfusion-Transmitted Dengue and Associated Clinical Symptoms During the 2012 Epidemic in Brazil. *J Infect Dis*. 2016 Mar 1;213(5):694-702. doi: 10.1093/infdis/jiv326. Epub 2015 Jun 8. PMID: 26908780; PMCID: PMC4747611. SABINO, E.C. et al. Transfusion-transmitted Dengue and Associated Clinical Symptoms during the 2012 Epidemic in Brazil. *Transfusion-Transmitted Dengue and Associated Clinical*. 2016;213:694-702.

SANTOS, F.L.S. et al. Vaso-occlusive crisis in a sickle cell patient after transfusion-transmitted dengue infection. *Transfusion*. 2020; 60(9):2139-2143.

SLAVOV SN, HESPANHOL MR, RODRIGUES ES, LEVI JE, UBIALI EMA, COVAS DT, KASHIMA S. Zika virus RNA detection in asymptomatic blood donors during an outbreak in the northeast region of São Paulo State, Brazil, 2016. *Transfusion*. 2017 Dec;57(12):2897-2901.

STORCH EK, CUSTER BS, JACOBS MR, MENITOVE JE, MINTZ PD. Review of current transfusion therapy and blood banking practices. *Blood Rev*. 2019 Nov;38:100593.

STRAMER SL, LINNEN JM, CARRICK JM, FOSTER GA, KRYSZTOF DE, ZOU S, DODD RY, TIRADO-MARRERO LM, HUNSPERGER E, SANTIAGO GA, MUÑOZ-JORDAN JL, TOMASHEK KM. Dengue viremia in blood donors identified by RNA and detection of dengue transfusion transmission during the 2007 dengue outbreak in Puerto Rico. *Transfusion*. 2012 Aug;52(8):1657-66.

TAMBYAH PA, KOAY ES, POON ML, LIN RV, ONG BK. Transfusion-Transmitted Dengue Infection Study Group. Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. *N Engl J Med*. 2008 Oct 2;359(14):1526-7.

TEO D, NG LC, LAM S. Is dengue a threat to the blood supply? *Transfus Med*. 2009 Apr;19(2):66-77.

WILDER-SMITH A, CHEN LH, MASSAD E, WILSON ME. Threat of dengue to blood safety in dengue-endemic countries. *Emerg Infect Dis*. 2009 Jan;15(1):8-11.

YADAV SK, HUSSEIN G, LIU B, VOJJALA N, WARSAME M, EL LABBAN M, RAUF I, HASSAN M, ZAREEN T, USAMA SM, ZHANG Y, JAIN SM, SURANI SR, DEVULAPALLY P, BARTLETT B, KHAN SA, JAIN NK. A Contemporary Review of Blood Transfusion in Critically Ill Patients. *Medicina (Kaunas)*. 2024 Jul 31;60(8):1247.

ZHANG, Y.; LIU, X.; WU, Z.; FENG, S.; LU, K.; ZHU, W.; SUN, H.; NIU, G. J. V. R. Oropouche virus: a neglected global arboviral threat. *Virus Research*. 2024;341:199318.