

V2 - Monitoramento genético como controle de qualidade da Vacina de Febre Amarela 17DD e de casos de eventos adversos

Cristiane Pinheiro Pestana^{1*}; Rafael Lawson Ferreira²; Ricardo Galler¹; Marcos da Silva Freire¹; Marco Alberto Medeiros¹.

1 - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ;

2 - INCQS/FIOCRUZ

Introdução:

Atualmente disponibilizada por sete fornecedores, a vacina 17D de febre amarela (VFA) foi elaborada em 1937 e 20 a 60 milhões de doses são administradas por ano. Duas linhagens principais são utilizadas para a sua produção: 17D-204 e 17DD. A vacina produzida por Bio-Manguinhos contém a cepa 17DD, oriunda de passagens subsequentes do vírus 17D na 195ª subcultura. A vacina 17D é considerada uma das mais seguras e eficazes já produzidas, entretanto, raros eventos adversos neuro e viscerotrópicos são identificados. A variabilidade genética entre os vírus selvagens e vacinais é bem conhecida permitindo diferenciá-los molecularmente.

Objetivo:

Desenvolver um protocolo para identificação molecular do vírus 17D vacinal por sequenciamento do genoma completo e demonstrar o seu potencial como ferramenta no monitoramento genético do vírus vacinal e em casos de eventos adversos associados à vacinação antiamarílica.

Metodologia:

Entre 2012 e 2014, foram sequenciados 43 lotes vacinais, o lote-semente 993FB013Z (lote atual de produção), e o RNA viral oriundo de um caso de efeito adverso. Para o sequenciamento do genoma completo do vírus 17DD, 54 oligonucleotídeos foram desenhados, utilizando-se ferramentas *in silico*. Em seguida 9 reações utilizando alguns dos oligos descritos anteriormente, foram padronizadas para a amplificação do RNA viral por RT-PCR. O sequenciamento foi realizado com o Kit *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing*, e as eletroforeses capilares foram conduzidas no sequenciador automático *Genetic Analyzer 3500XL*. Para as análises *in silico* utilizamos o programa DNASTAR 5.05.

Resultados:

As sequências nucleotídicas dos genomas analisados foram completamente elucidadas em duas cadeias. Todos os RNAs avaliados apresentaram o número de nucleotídeos característico (10.862 pb). O genoma dos lotes vacinais e do material oriundo de efeito adverso exibiram 100% de identidade nucleotídica com o vírus semente, e consequentemente, o alinhamento da poliproteína não evidenciou troca de aminoácidos. Os dados gerados pela análise nucleotídica de 43 lotes VFA 17DD demonstram estabilidade genética da vacina e reprodutibilidade e robustez do protocolo desenvolvido pelo grupo. Em relação ao caso fatal de evento adverso os nossos resultados corroboram os dados da literatura, nos quais a ausência de mudanças nucleotídicas específicas sugere que fatores inerentes ao hospedeiro são os principais determinantes da gravidade do quadro clínico pós-vacinal.

Conclusão:

O método desenvolvido mostrou-se uma ferramenta para o monitoramento da variabilidade genética dos lotes da VFA 17DD e de casos de eventos adversos associados. A literatura vigente e nossos achados reforçam que a VFA é uma vacina segura e eficaz e com alta estabilidade genética durante o processo de produção e após administração *in vivo*. Adicionalmente, um estudo mais aprofundado e robusto poderia avaliar a troca dos ensaios de neurovirulência em macacos pelo sequenciamento viral para a validação de lotes sementes para a produção de vacina, corroborando as orientações atuais de substituir os ensaios em animais por testes *in vitro*.

Palavras-Chave: Vacina de Febre Amarela, Vírus 17DD, Evento Adverso, Sequenciamento nucleotídico