

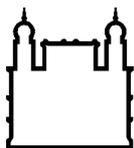
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Medicina Tropical

**OTIMIZAÇÃO, PADRONIZAÇÃO, VALIDAÇÃO E AVALIAÇÃO COMPARATIVA  
DE TESTES DE QUANTIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS NEUTRALIZANTES PARA  
O VÍRUS DA FEBRE AMARELA**

**MARISOL SIMÕES**

Rio de Janeiro  
Maio de 2018



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

***MARISOL SIMÕES***

Otimização, Padronização, Validação e Avaliação Comparativa de Testes de Quantificação dos Anticorpos Neutralizantes para o Vírus da Febre Amarela

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

**Orientadores:** Prof. Dr. Luiz Antonio Bastos Camacho  
Prof. Dra. Sheila Maria Barbosa de Lima

**RIO DE JANEIRO**  
Maio de 2018

Simões, Marisol.

Otimização, Padronização, Validação e Avaliação Comparativa de Testes de Quantificação dos Anticorpos Neutralizantes para o Vírus da Febre Amarela / Marisol Simões. - Rio de Janeiro, 2018.

xix, 183 f.; il.

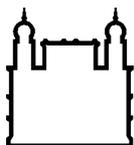
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2018.

Orientador: Luiz Antonio Bastos Camacho.

Co-orientadora: Sheila Maria Barbosa de Lima.

Bibliografia: f. 136-160

1. Febre Amarela. 2. Testes de Neutralização. 3. PRNT. 4. Validação. 5. Padronização. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**AUTOR: MARISOL SIMÕES**

**OTIMIZAÇÃO, PADRONIZAÇÃO, VALIDAÇÃO E AVALIAÇÃO COMPARATIVA  
DE TESTES DE QUANTIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS NEUTRALIZANTES PARA  
O VÍRUS DA FEBRE AMARELA**

**ORIENTADORES: Prof. Dr. Luiz Antonio Bastos Camacho  
Prof. Dra. Sheila Maria Barbosa de Lima**

**Aprovada em: 04/05/2018**

**EXAMINADORES:**

**Profa. Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto – Presidente (IOC/Fiocruz)**

**Profa. Dra. Fernanda Carvalho de Queiroz Mello (UFRJ)**

**Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho (CPQRR/Fiocruz)**

**Prof. Dr. Marcos da Silva Freire (Bio-Manguinhos/Fiocruz)**

**Prof. Dr. Zilton Farias Meira de Vasconcelos (IFF/Fiocruz)**

Rio de Janeiro, 04 de Maio de 2018.

*À minha amiga Anna Maya Yoshida,  
por todo aprendizado, confiança e  
oportunidades.*

*Ao meu marido Bruno Azevedo, meu  
equilíbrio, pela paciência, sensatez e  
parceria em todos os momentos da  
minha vida.*

*À minha mãe, minha fonte de fé e  
energia, pelo apoio e amor.*

## AGRADECIMENTOS

À Bio-Manguinhos e à Fiocruz, pelo financiamento e todo suporte técnico-científico.

À coordenação e à secretaria da pós-graduação em Medicina Tropical pela confiança, orientações e apoio, especialmente nos embarços ocorridos ao longo deste trabalho.

Aos meus orientadores, Luiz Camacho e Sheila Lima, pela confiança no meu trabalho e por terem acreditado neste estudo. Obrigada pela oportunidade, aprendizado e dedicação.

À Anna Maya Yoshida, que me ensinou tudo que sabia sobre PRNT, esteve comigo na bancada desde o meu primeiro teste (com aquela calma e paciência peculiares) e me deu a oportunidade de realizar este trabalho. Muito obrigada por todo aprendizado, confiança, incentivos e amizade (mesmo que, agora, de longe).

Aos meus mais que colegas de trabalho, amigos: Stephanie, André Tavares, Renata Carvalho, Luiz Gustavo e Ygara Mendes. A participação (bastante ativa) e amizade de vocês foram fundamentais para eu sobreviver e conseguir concluir essa jornada.

À equipe do PRNT e do setor de células do LATEV: Emily, Carol, Torre, Vanessa, Carmem, Kelly, Vivi e Guilherme. Sem o suporte de vocês a conclusão desse trabalho não seria possível.

À toda equipe do  $\mu$ PRN de dengue do Latev, especialmente Renan, Wal, Caio e Nathalia. Obrigada por todo suporte técnico-científico, pelos empréstimos de reagentes, a disponibilidade de espaço e a ajuda na leitura das (milhares) de placas!

À toda equipe maravilhosa do Latev. Sem ela eu não teria conseguido finalizar esse trabalho. TODOS, de alguma maneira, me ajudaram nessa jornada, mesmo que fosse para dar leveza aos dias pesados de trabalho.

À Beatriz Borges, pela confiança e a oportunidade de realizar o início da transferência da metodologia do  $\mu$ PRN para dengue da GSK para o Latev; mas também pelo apoio e por ter feito o primeiro contato com a equipe da GSK para propor a realização deste trabalho de colaboração.

Aos colaboradores da GSK/Bélgica, especialmente Patrice Pierson, Francis Dessy e Jessica Vanderhaegen, não somente pelo aceite em realizar esse trabalho

conosco, mas também pela construtiva e sempre agradável colaboração. Obrigada pela confiança, disponibilidade e aprendizado.

Aos demais Laboratórios e Departamentos de Bio-Manguinhos que contribuíram para a realização desse trabalho: LATAM, LAMAM, LATED, NitBio, Asclin, DITIN, SEAPO, AADM-VDTEC, LAMEV, DELOG.

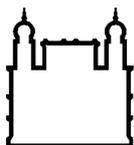
À minha família, pelo amor, apoio, paciência e compreensão (em muitas ausências): mama Vânia, meus irmãos Wallace, William e Sissi e meus sobrinhos Dudu, Sofia e Caio.

Ao meu marido Bruno. Simplesmente porque “o que seria de mim sem você?” Obrigada por estar sempre ao meu lado.

A Deus. Pela minha vida. Pela proteção. Pela força. Pela determinação.

*“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós!”*

**Chico Xavier**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

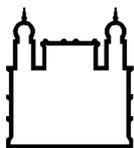
### OTIMIZAÇÃO, PADRONIZAÇÃO, VALIDAÇÃO E AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE TESTES DE QUANTIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS NEUTRALIZANTES PARA O VÍRUS DA FEBRE AMARELA.

#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

**Marisol Simões**

A febre amarela (FA) é uma doença infecciosa aguda, febril, causada pelo vírus protótipo do gênero *Flavivirus*. A doença permanece como grande problema de saúde pública, principalmente em regiões endêmicas da África e América do Sul. No Brasil, ondas alarmantes de epizootias e epidemias são registradas desde 2016. A vacinação é a maneira mais eficaz de prevenção e controle da FA. As vacinas disponíveis produzidas com as subcepas 17D-204 e 17DD são seguras e imunogênicas, induzindo a formação de anticorpos neutralizantes que aparecem precocemente, são protetores e de longa duração. Apesar de ser considerado referência para a análise da resposta imune protetora após a vacinação, a metodologia clássica do teste de neutralização por redução de placas de lise (PRNT) é trabalhoso, de difícil execução, requer recursos humanos, equipamentos e insumos específicos, além de um tempo longo para a sua finalização, mesmo na versão micro PRNT (em placas de 96 poços). Esta adaptação do método é mais operacional do que o PRNT (em placas de 6 poços), com maior capacidade de processamento das amostras. Mas, além das desvantagens semelhantes ao teste referência, apresenta a dificuldade de leitura das placas de lise por ser realizado em poços menores. A busca por um teste mais rápido, semiautomatizado e eficiente para a quantificação de anticorpos neutralizantes vem ao encontro das necessidades de aumento da capacidade e melhoria de análises das amostras de estudos clínicos. O presente estudo objetivou não somente otimizar a metodologia já utilizada na rotina do Laboratório de Tecnologia Viroológica para os estudos de avaliação de imunogenicidade das vacinas para FA (micro PRNT), mas também padronizar uma metodologia mais rápida e semiautomatizada denominada  $\mu$ PRN-HRP. A partir da definição dos protocolos de execução, ambas as metodologias foram validadas com os parâmetros de precisão, exatidão, seletividade e robustez. Posteriormente à validação, 200 soros de indivíduos vacinados foram processados pelas três metodologias para a avaliação da concordância (Coeficiente de Correlação Intraclasse, CCI) dos testes índices (micro PRNT e  $\mu$ PRN-HRP) com o teste referência (PRNT). Os critérios de análise predefinidos para todos os ensaios de validação foram alcançados pelas metodologias em placas de 96 poços. O micro PRNT apresentou concordância moderada a substancial com o PRNT tanto para os títulos em  $\log_{10}$  da recíproca da diluição (CCI de 0,59 e 0,74) quanto para os títulos em  $\log_{10}$  de mUI/mL (CCI de 0,48 e 0,65). O  $\mu$ PRN-HRP apresentou concordância de fraca a moderada com o PRNT para os títulos em  $\log_{10}$  da recíproca da diluição (CCI de 0,29 e 0,45). Mas, para os títulos em  $\log_{10}$  mUI/mL, os estimadores de concordância apresentaram magnitude substancial a quase completa com o PRNT (CCI de 0,69 e 0,82). Os coeficientes de correlação linear obtidos para os testes índices foram muito próximos, sugerindo correlação moderada ( $r > 0,70$ ) com o teste referência para os títulos em recíproca da diluição e em mUI/mL. Portanto, tanto o micro PRNT quanto o  $\mu$ PRN-HRP podem ser utilizados na avaliação das vacinas para FA, gerando resultados confiáveis. O  $\mu$ PRN-HRP destaca-se por ser um teste mais rápido, semiautomatizado e com maior capacidade de processamento de amostras.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### OPTIMIZATION, STANDARDIZATION, VALIDATION AND COMPARATIVE EVALUATION OF QUANTIFICATION TESTS OF THE NEUTRALIZING ANTIBODIES FOR THE YELLOW FEVER VIRUS.

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN TROPICAL MEDICINE

**Marisol Simões**

Yellow fever (YF) is an acute, febrile infectious disease caused by the prototype virus of the genus *Flavivirus*. The disease remains a major public health problem, especially in endemic areas in Africa and South America. In Brazil, alarming waves of epizootics and epidemics have been reported since 2016. Vaccination is the most effective way to prevent and control YF. The available vaccines produced with 17D-204 and 17DD substrains are safe and immunogenic, inducing the formation of neutralizing antibodies that appear early, are protective and long lasting. Although it is considered a reference for the analysis of the protective immune response after vaccination, the classical methodology of the plaque reduction neutralization test (PRNT) is labor intensive, difficult to execute, requires specific human resources, equipment and inputs, besides a long time for its finalization, even in the micro PRNT version (in 96-well plates). This adaptation of the method is more operational than the PRNT (in 6-well plates), with higher sample throughput. But, in addition to the disadvantages similar to the reference test, it presents the difficulty of reading plaques by being run in smaller wells. The search for a faster, semi-automated and efficient test for the quantification of neutralizing antibodies meets the needs of increasing throughput and improving analyzes of clinical trial samples. The present study aimed not only to optimize the methodology already used in the routine of the Virological Technology Laboratory in the immunogenicity evaluation studies of the vaccines for YF (micro PRNT), but also to standardize a faster and semi-automated methodology called  $\mu$ PRN-HRP. From the definition of the execution protocols, both methodologies were validated with the parameters of precision, accuracy, selectivity and robustness. After the validation, 200 sera of vaccinees were processed by the three methodologies for the evaluation of the agreement (Intraclass Correlation Coefficient, ICC) of the index tests (micro PRNT and  $\mu$ PRN-HRP) with the reference test (PRNT). The predefined analysis criteria for all validation assays were achieved by methodologies in 96-well plates. The micro PRNT showed moderate to substantial agreement with the PRNT for both  $\log_{10}$  titers of the reciprocal dilution (ICC of 0.59 and 0.74) and  $\log_{10}$  mIU/mL titers (ICC of 0.48 and 0.65). The  $\mu$ PRN-HRP showed weak to moderate agreement with the PRNT for  $\log_{10}$  titers of reciprocal dilution (ICC of 0.29 and 0.45). However, for  $\log_{10}$  mIU/mL titers, the agreement estimators showed a substantial to almost complete magnitude with PRNT (ICC of 0.69 and 0.82). The linear correlation coefficients obtained for the index tests were very close, suggesting a moderate correlation ( $r > 0.70$ ) with the reference test for titers in reciprocal dilution and in mIU/mL. Thus, both micro PRNT and  $\mu$ PRN-HRP can be used to evaluate vaccines for YF, generating reliable results. The  $\mu$ PRN-HRP stands out as being a faster, semi-automated and with a higher sample throughput.

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Febre Amarela</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Características Gerais da Doença .....	1
1.1.2	Epidemiologia .....	2
1.1.3	O Vírus.....	14
1.1.4	Respostas Celular e Humoral do Hospedeiro ao Vírus .....	21
1.1.5	A Vacina .....	27
1.1.6	Testes Sorológicos para a Quantificação de Anticorpos .....	34
1.1.7	Avaliação do Desempenho de Teste Diagnóstico .....	40
1.2	<b>Justificativa</b> .....	<b>42</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>45</b>
2.1	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>45</b>
2.2	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>45</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>46</b>
3.1	<b>Soluções e Reagentes</b> .....	<b>46</b>
3.2	<b>Soros e Considerações Éticas</b> .....	<b>49</b>
3.2.1	Soros Preparados Internamente.....	49
3.2.2	Soros Comerciais .....	50
3.2.3	Soros de Doadores Humanos.....	50
3.2.4	Preparo dos Soros Padrões.....	52
3.3	<b>Células</b> .....	<b>52</b>
3.4	<b>Vírus</b> .....	<b>53</b>
3.4.1	Produções Virais.....	53
3.4.2	Titulação Viral .....	55
3.4.3	Determinação da Diluição Viral para os Ensaios de Neutralização .....	55
3.5	<b>Testes de Neutralização</b> .....	<b>56</b>
3.5.1	PRNT – Teste Referência (placa 6 poços) .....	56
3.5.2	Micro PRNT – placa 96 poços .....	59
3.5.3	µPRN-HRP – placa 96 poços .....	62

3.5.4	Cálculo do Título de Anticorpos Neutralizantes .....	66
3.5.5	Testes de Calibração dos Soros Padrões.....	68
<b>3.6</b>	<b>Validação dos Testes Índices.....</b>	<b>68</b>
3.6.1	Precisão (ou confiabilidade).....	69
3.6.2	Exatidão (ou capacidade de diluição) .....	70
3.6.3	Seletividade (ou especificidade) .....	70
3.6.4	Robustez.....	71
<b>3.7</b>	<b>Avaliação Comparativa .....</b>	<b>73</b>
<b>3.8</b>	<b>Análises Estatísticas.....</b>	<b>73</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>74</b>
<b>4.1</b>	<b>Titulação Viral.....</b>	<b>74</b>
<b>4.2</b>	<b>micro PRNT – placa 96 poços .....</b>	<b>74</b>
4.2.1	Determinação da Faixa de Placas de Lise por Poço no Controle Viral .....	74
4.2.2	Calibração dos Soros Padrões .....	84
4.2.3	Validação do Teste .....	85
<b>4.3</b>	<b>µPRN-HRP – placa 96 poços .....</b>	<b>90</b>
4.3.1	Padronização do teste .....	90
4.3.2	Calibração dos Soros Padrões .....	114
4.3.3	Validação do Teste .....	115
<b>4.4</b>	<b>Avaliação Comparativa .....</b>	<b>119</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>126</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>135</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>136</b>
<b>8</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>1361</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b> Ciclos de transmissão do vírus da FA.....	<b>4</b>
<b>Figura 1.2:</b> Série histórica do número de casos humanos confirmados de FA silvestre e a letalidade no Brasil, 1980 a 2016. ....	<b>9</b>
<b>Figura 1.3:</b> Organização do genoma e funções das proteínas virais de <i>Flavivirus</i> ...	<b>16</b>
<b>Figura 1.4:</b> Formas das partículas virais.....	<b>18</b>
<b>Figura 1.5:</b> Desenho esquemático do ciclo de replicação dos <i>Flavivirus</i> . ....	<b>20</b>
<b>Figura 3.1:</b> Placa de 6 poços representativa do PRNT de FA.....	<b>58</b>
<b>Figura 3.2:</b> Esquema do protocolo de execução do PRNT de FA.....	<b>58</b>
<b>Figura 3.3:</b> Placa representativa do micro PRNT de FA.....	<b>61</b>
<b>Figura 3.4:</b> Esquema do protocolo de execução do micro PRNT de FA. ....	<b>62</b>
<b>Figura 3.5:</b> Esquema geral do protocolo de execução do $\mu$ PRN-HRP de FA. ....	<b>66</b>
<b>Figura 4.1:</b> Gráficos de Boxplot das diluições virais avaliadas em diferentes ensaios de micro PRNT com 1 hora de neutralização. ....	<b>77</b>
<b>Figura 4.2:</b> Gráficos de Boxplot dos ensaios de micro PRNT com 1 hora de neutralização para as diferentes diluições avaliadas do vírus 17D-213/77.....	<b>78</b>
<b>Figura 4.3:</b> Gráficos de Boxplot das diluições virais avaliadas em diferentes ensaios de micro PRNT com 2 horas de neutralização. ....	<b>79</b>
<b>Figura 4.4:</b> Gráficos de Boxplot dos ensaios de micro PRNT com 2 horas de neutralização para as diferentes diluições avaliadas do vírus 17D-213/77.....	<b>80</b>
<b>Figura 4.5:</b> Imagens representativas das variáveis fundamentais e condições testadas no processo de padronização do $\mu$ PRN-HRP de FA – grupo I.....	<b>91</b>
<b>Figura 4.6:</b> Imagens representativas das variáveis fundamentais e condições testadas no processo de padronização do $\mu$ PRN-HRP de FA – grupos I-IV.....	<b>92</b>
<b>Figura 4.7:</b> Imagens representativas de 3 ensaios de $\mu$ PRN-HRP para a diluição seriada de fator 10 da cepa 17D-213/77. ....	<b>93</b>
<b>Figura 4.8:</b> Imagens representativas de 10 ensaios de $\mu$ PRN-HRP com 2 horas de neutralização para a diluição seriada de fator 2 da cepa 17D-213/77.....	<b>95</b>
<b>Figura 4.9:</b> Imagens representativas de 10 ensaios de $\mu$ PRN-HRP com 1 hora e 30 minutos de neutralização para a diluição seriada de fator 2 da cepa 17D-213/77. ....	<b>96</b>
<b>Figura 4.10:</b> Imagens representativas de 10 ensaios de $\mu$ PRN-HRP com 1 hora de neutralização para a diluição seriada de fator 2 da cepa 17D-213/77.....	<b>97</b>

<b>Figura 4.11:</b> Boxplots das contagens de PFU/poço das titulações de fator 2, simulando o $\mu$ PRN-HRP, com tempo de neutralização de 2 horas.....	<b>98</b>
<b>Figura 4.12:</b> Boxplots das contagens de PFU/poço das titulações de fator 2, simulando o $\mu$ PRN-HRP, com tempo de neutralização de 1 hora e 30 minutos. ....	<b>99</b>
<b>Figura 4.13:</b> Boxplots das contagens de PFU/poço das titulações de fator 2, simulando o $\mu$ PRN-HRP, com tempo de neutralização de 1 hora.....	<b>100</b>
<b>Figura 4.14:</b> Boxplots das contagens de PFU/poço das titulações de fator 2, simulando o $\mu$ PRN-HRP, nos diferentes tempos de neutralização avaliados e considerando a unificação das diferentes diluições do 4G2-HRP.....	<b>101</b>
<b>Figura 4.15:</b> Imagens representativas de 2 ensaios de $\mu$ PRN-HRP para a diluição seriada de fator 10 da cepa 17D-213/77.....	<b>101</b>
<b>Figura 4.16:</b> Imagens representativas de 3 ensaios de $\mu$ PRN-HRP para a diluição seriada de fator 2 da cepa 17D-213/77.....	<b>102</b>
<b>Figura 4.17:</b> Imagens representativas de 3 ensaios de $\mu$ PRN-HRP testando diferentes concentrações do meio semissólido.....	<b>103</b>
<b>Figura 4.18:</b> Imagens representativas de 3 ensaios de $\mu$ PRN-HRP testando diferentes concentrações do meio semissólido e revelação em 36 horas.....	<b>104</b>
<b>Figura 4.19:</b> Imagens representativas de 2 ensaios de $\mu$ PRN-HRP, sem CMC e revelação em 36 horas.....	<b>106</b>
<b>Figura 4.20:</b> Protocolos de lavagem para retirada do meio semissólido das placas de $\mu$ PRN-HRP.....	<b>107</b>
<b>Figura 4.21:</b> Imagens representativas de 6 ensaios de $\mu$ PRN-HRP com 48 horas para revelação, testando diferentes concentrações do meio semissólido, soluções fixadoras e protocolos de lavagem.....	<b>107</b>
<b>Figura 4.22:</b> Imagens da placa resultante da adição de CMC a 2,0% e do protocolo 3 para sua remoção, representativas do teste piloto de $\mu$ PRN-HRP avaliando diferentes concentrações do meio semissólido e protocolos de lavagem.....	<b>108</b>
<b>Figura 4.23:</b> Imagens representativas de 2 ensaios de $\mu$ PRN-HRP para a avaliação de diferentes lotes de TB. ....	<b>109</b>
<b>Figura 4.24:</b> Protocolos de lavagem com “chuveirinho” para retirada do meio semissólido das placas de $\mu$ PRN-HRP.....	<b>110</b>
<b>Figura 4.25:</b> Imagens representativas de 2 ensaios de $\mu$ PRN-HRP testando diferentes protocolos de lavagem para retirada do CMC.....	<b>110</b>

<b>Figura 4.26:</b> Imagens representativas de 3 ensaios de $\mu$ PRN-HRP testando diferentes protocolos de lavagem, diluições do vírus e do anticorpo conjugado. ....	<b>111</b>
<b>Figura 4.27:</b> Imagens representativas de 3 ensaios de $\mu$ PRN-HRP testando diferentes protocolos de lavagem.....	<b>112</b>
<b>Figura 4.28:</b> Esquema do protocolo de execução do $\mu$ PRN-HRP de FA. ....	<b>114</b>
<b>Figura 4.29:</b> Gráficos de dispersão dos títulos de anticorpos neutralizantes para FA em recíproca da diluição. ....	<b>122</b>
<b>Figura 4.30:</b> Gráficos de dispersão dos títulos de anticorpos neutralizantes para FA em mUI/mL.....	<b>122</b>
<b>Figura 4.31:</b> Diagramas de Bland-Altman dos títulos de anticorpos neutralizantes para FA em recíproca da diluição.....	<b>123</b>
<b>Figura 4.32:</b> Diagramas de Bland-Altman dos títulos de anticorpos neutralizantes para FA em mUI/mL. ....	<b>124</b>
<b>Figura 4.33:</b> Mediana, percentis 25 e 75 dos títulos de anticorpos neutralizantes dos 200 soros processados pelos três testes de neutralização. ....	<b>125</b>

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 3.1:</b> Dados sobre a experiência prévia para <i>Flavivirus</i> (doença, vacina e título de anticorpos neutralizantes) de doadores dos soros selecionados. ....	<b>51</b>
<b>Quadro 3.2:</b> Condições testadas das variáveis do $\mu$ PRN-HRP de FA avaliadas na padronização.....	<b>64</b>
<b>Quadro 3.3:</b> Variáveis avaliadas nos ensaios de robustez para a validação dos.....	<b>72</b>
<b>Quadro 4.1:</b> Diluições (na microplaca) do vírus 17D-213/77 correspondentes a, aproximadamente, 30 PFU/poço.....	<b>75</b>
<b>Quadro 4.2:</b> Diluições (em tubos) do vírus 17D-213/77 correspondentes a, aproximadamente, 30 PFU/poço.....	<b>75</b>
<b>Quadro 4.3:</b> Quantidades médias de PFU/poço dos controles virais e seus respectivos coeficientes de variação (CV) de diferentes diluições do vírus 17D-213/77 em ensaios de micro PRNT com 1 hora de neutralização.....	<b>76</b>
<b>Quadro 4.4:</b> Quantidades médias de PFU/poço dos controles virais e seus respectivos coeficientes de variação (CV) de diferentes diluições do vírus 17D-213/77 em ensaios de micro PRNT com 2 horas de neutralização.....	<b>78</b>
<b>Quadro 4.5:</b> TMGs de anticorpos neutralizantes para FA de soros processados pelo micro PRNT com tempo de neutralização de 1 hora, para diferentes diluições virais da cepa 17D-213/77.....	<b>81</b>
<b>Quadro 4.6:</b> TMGs de anticorpos neutralizantes para FA de soros processados pelo micro PRNT com tempo de neutralização de 2 horas, para diferentes diluições virais da cepa 17D-213/77.....	<b>82</b>
<b>Quadro 4.7:</b> Análise comparativa de ensaios de micro PRNT com 1 ou 2 horas de neutralização de soros com diferentes níveis de anticorpos neutralizantes para FA, submetidos a diferentes diluições do vírus 17D-213/77. ....	<b>84</b>
<b>Quadro 4.8:</b> Dados de avaliação da precisão intraensaio do micro PRNT de FA. ...	<b>86</b>
<b>Quadro 4.9:</b> Dados de avaliação da precisão interensaio do micro PRNT de FA: mesmo operador, ensaios diferentes. ....	<b>86</b>
<b>Quadro 4.10:</b> Dados de avaliação da precisão interensaio do micro PRNT de FA: operadores diferentes, ensaios diferentes. ....	<b>87</b>
<b>Quadro 4.11:</b> Dados de avaliação da exatidão do micro PRNT de FA.....	<b>88</b>
<b>Quadro 4.12:</b> Dados de avaliação da seletividade do micro PRNT de FA. ....	<b>89</b>
<b>Quadro 4.13:</b> Dados de avaliação da robustez do micro PRNT de FA. ....	<b>90</b>

<b>Quadro 4.14:</b> Condições testadas e escolhidas das variáveis do $\mu$ PRN-HRP de FA avaliadas na padronização.....	<b>113</b>
<b>Quadro 4.15:</b> Dados de avaliação da precisão intraensaio do $\mu$ PRN-HRP de FA.	<b>116</b>
<b>Quadro 4.16:</b> Dados de avaliação da precisão interensaio do $\mu$ PRN-HRP de FA: mesmo operador, ensaios diferentes. ....	<b>116</b>
<b>Quadro 4.17:</b> Dados de avaliação da precisão interensaio do $\mu$ PRN-HRP de FA: operadores diferentes, ensaios diferentes. ....	<b>117</b>
<b>Quadro 4.18:</b> Dados de avaliação da exatidão do $\mu$ PRN-HRP de FA. ....	<b>118</b>
<b>Quadro 4.19:</b> Dados de avaliação da seletividade do $\mu$ PRN-HRP de FA. ....	<b>118</b>
<b>Quadro 4.20:</b> Dados de avaliação da robustez do $\mu$ PRN-HRP de FA.....	<b>120</b>
<b>Quadro 4.21:</b> CCI determinado a partir dos títulos de anticorpos neutralizantes ( $\log_{10}$ recíproca da diluição) de 200 soros para a análise de concordância entre o PRNT, micro PRNT e $\mu$ PRN-HRP de FA.....	<b>121</b>
<b>Quadro 4.22:</b> CCI determinado a partir dos títulos de anticorpos neutralizantes ( $\log_{10}$ mUI/mL) de 200 soros para a análise de concordância entre o PRNT, micro PRNT e $\mu$ PRN-HRP de FA.. ....	<b>121</b>
<b>Quadro 4.23:</b> Coeficientes de correlação de Pearson (r) dos resultados obtidos ( $\log_{10}$ recíproca da diluição) dos 200 soros submetidos ao PRNT, micro PRNT e $\mu$ PRN-HRP de FA.. ....	<b>121</b>
<b>Quadro 4.24:</b> Coeficientes de correlação de Pearson (r) dos resultados obtidos ( $\log_{10}$ mUI/mL) dos 200 soros submetidos ao PRNT, micro PRNT e $\mu$ PRN-HRP de FA.....	<b>121</b>
<b>Quadro 4.25:</b> Estatística descritiva dos 200 soros submetidos ao PRNT, micro PRNT e $\mu$ PRN-HRP de FA.....	<b>124</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\mu$ PRN-HRP – do inglês "micro Plaque Reduction Neutralization - Horseradish Peroxidase"

aa – aminoácido

ADE – potencialização da infecção dependente de anticorpo (do inglês "Antibody-Dependent Enhancement")

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – do inglês "American Type Culture Collection"

BSA – albumina sérica bovina (do inglês "Bovine Serum Albumin")

C – proteína do Capsídeo

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

Cat. – número de catálogo do reagente.

CCI – coeficiente de correlação intraclasse

CD – do inglês "Cluster of Differentiation"

CF – fixação do complemento (do inglês "Complement-Fixing")

CMC – carboximetilcelulose

CPE – efeito citopático (do inglês "Cytopathic Effect")

CV – coeficiente de variação

DPBS – do inglês "Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline"

E – proteína do Envelope

EDTA – ácido etilenodiamino tetraacético (do inglês "Ethylenediaminetetraacetic acid")

EMEM – do inglês "Eagle's minimal essential medium"

ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

EP<sub>50</sub> – do inglês "end-point" de 50%

FA – Febre Amarela

Fc $\gamma$ R – Receptor gama Fc (do inglês "gamma Fc Receptor")

FDA – do inglês "Food and Drug Administration"

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

GSK – Glaxosmithkline

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

HI – inibição da hemaglutinação (do inglês "Hemagglutination Inhibiting")

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês “Human Immunodeficiency Virus”)

HRP – do inglês “Horseradish Peroxidase”

IFA – anticorpo fluorescente indireto (do inglês “Indirect Fluorescent Antibody”)

IFN – interferon

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

INI – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

kb – quilobase

kDa – quilodalton

LAMAM – Laboratório de Macromoléculas

LATAM – Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais

LATED – Laboratório de Tecnologia Diagnóstica

LATEV – Laboratório de Tecnologia Viroológica

LNI – log do índice de neutralização (do inglês “Log Neutralization Index”)

LSH – do inglês “Long Stable Hairpin”

M – proteína da Membrana

MAC-ELISA – ensaio imunoenzimático de captura de anticorpos IgM (do inglês “IgM antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay”)

MIP1 – do inglês “Macrophage Inflammatory Protein-1”

MOI – multiplicidade de infecção (do inglês “Multiplicity of Infection”)

MS – Ministério da Saúde

N – Neutralização

NA – não se aplica

NaHCO<sub>3</sub> – bicarbonato de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

NCR – região não codificante (do inglês “Non-Coding Region”)

NIBSC – do inglês “National Institute for Biological Standards and Control”

NS – não estrutural (do inglês “Non-Structural”)

nt – nucleotídeo

NTPase - Nucleosil Trifosfato Hidrolase

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF – fase de leitura aberta (do inglês “Open Reading Frame”)

PBS – solução salina tamponada de fosfato (do inglês “Phosphate-Buffered Saline”)

PDL – taxa de duplicação da população de células (do inglês “Population Doubling Level”)

PFU – unidade formadora de placa de lise (do inglês “Plaque-Forming Unit”)

pH – potencial hidrogeniônico

prM – proteína precursora da proteína M

PRNT – teste de neutralização por redução de placas de lise (do inglês “Plaque Reduction Neutralization Test”)

q.s.p – quantidade suficiente para (do latim “*quantum satis para*”)

RdRp – RNA polimerase RNA-dependente (do inglês “RNA-dependent RNA polymerase”)

RE – Retículo Endoplasmático

RNA – ácido ribonucleico (do inglês “Ribonucleic Acid”)

RSI – Regulamento Sanitário Internacional

RTPase - RNA 5' trifosfatase

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (do inglês “Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction”)

SAGE – Grupo Consultivo Estratégico de Especialistas (do inglês “Strategic Advisory Group of Experts”)

TB – do inglês “True Blue”

Th – T auxiliar (do inglês “T helper”)

TLR – receptor do tipo Toll (do inglês “Toll-Like Receptor”)

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

TMG – Título Médio Geométrico

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa (do inglês “Tumor Necrosis Factor alpha”)

UI – Unidade Internacional

YEL-AND – doença neurotrópica associada à vacina da FA (do inglês “Yellow fever vaccine Associated Neurotropic Disease”)

YEL-AVD – doença viscerotrópica associada à vacina da FA (do inglês “Yellow fever vaccine Associated Viscerotropic Disease”)

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Febre Amarela

### 1.1.1 Características Gerais da Doença

A febre amarela (FA) é uma doença viral não contagiosa e, assim como outras doenças infecciosas, apresenta um amplo espectro clínico que pode variar desde infecção assintomática (inaparente) até uma doença fatal, apresentando-se, em sua forma clássica, como febre hemorrágica de elevada letalidade<sup>1</sup>. A partir de estudos de campo na África, a taxa de infecção inaparente a aparente foi de aproximadamente 7-12:1<sup>2</sup>.

A patofisiologia da FA em macacos rhesus e em humanos é caracterizada por disfunção hepática, insuficiência renal, coagulopatia e choque, certo que os macacos desenvolvem doença mais fulminante, durando de 3 a 4 dias apenas<sup>2-6</sup>.

A FA pode ser considerada protótipo de febre hemorrágica viral, caracterizada em humanos como uma doença aguda grave, com febre, náusea, vômito, dor epigástrica, hepatite com icterícia, insuficiência renal, hemorragia, choque e óbito em 20-60% dos casos<sup>1</sup>. A doença apresenta três períodos distintos, embora por vezes imperceptíveis, quais sejam, a infecção, a remissão e a intoxicação<sup>7</sup>.

A FA normalmente se apresenta como uma infecção febril autolimitada com mialgias. Em 25-50% dos casos, pode progredir para uma síndrome hemorrágica com icterícia e doença renal. O período de incubação após a picada do mosquito vetor costuma variar entre 3 e 6 dias, a partir de quando sobrevêm os sinais clínicos, como dor de cabeça, febre, perda de apetite, vômitos, dores musculares e articulares<sup>8</sup>.

O período de remissão começa 3 a 4 dias após o início dos primeiros sintomas<sup>8</sup>. Neste estágio, os sinais clínicos diminuem e o paciente pode entrar em remissão ou progredir para o terceiro período (intoxicação), caracterizado pela retomada de febre alta, náuseas, vômitos, dor abdominal e alterações na consciência<sup>7,8</sup>. O paciente fica letárgico e desidratado devido aos vômitos prolongados e à ingestão insuficiente de líquidos e nutrientes. Pode aparecer icterícia em virtude dos danos causados às células do fígado pela quantidade excessiva de bilirrubina, assim como sangramentos das mucosas nasal e oral, hematêmese e hemorragias petequiais. O paciente pode piorar devido aos efeitos combinados da

insuficiência renal hepática e hipotensão por perda de fluido, disfunção capilar e sangramento, sucumbindo à doença 7 a 10 dias após o início dos sintomas<sup>9</sup>.

A viremia mais alta do indivíduo infectado começa antes do período febril e após 3 a 5 dias<sup>10</sup>. A comparação de amostras clínicas obtidas de infecções humanas associadas a um surto na República da Guiné em 2000 demonstrou que pacientes com FA grave (desfecho fatal ou sinais hemorrágicos não fatais) apresentaram uma viremia tipicamente mais alta e níveis elevados de citocinas inflamatórias quando comparados com os casos de FA menos graves, ressaltando a importância da resposta do hospedeiro na patogênese da FA<sup>11</sup>.

A replicação viral nos tecidos locais e linfáticos ocorre quando o mosquito alimentado de sangue com o vírus da FA pica um indivíduo suscetível. No sangue, o vírus se espalha para a medula óssea e outros órgãos, levando às manifestações clínicas patogênicas características da doença<sup>10</sup>.

O vírus da FA é viscerotrópico e o fígado é o órgão alvo mais comum. A severidade da doença no fígado depende, em grande parte, em quão alta a carga viral está no sangue. No entanto, outros órgãos também são afetados, como o coração, baço e rins, cujo envolvimento pode resultar em azotemia, necrose tubular aguda e anúria. Casos fatais de FA são geralmente associados com falhas renais. No estágio final, a doença avança muito rapidamente levando à falência múltipla dos órgãos e choque<sup>10</sup>.

### **1.1.2 Epidemiologia**

Desde meados dos anos de 1600, o vírus da FA foi responsável por inúmeras epidemias em toda a América, África e partes da Europa<sup>12</sup>. A floresta tropical de baixa altitude, o ecótono floresta-savana e as savanas são os mais importantes ecossistemas associados com a FA tanto na África quanto na América do Sul, continentes que centralizam grande parte das regiões endêmicas para a doença. Estes ambientes são ricos em bacias hidrográficas e florestas ribeirinhas (galerias), habitat para primatas não humanos e exposição a espécies de vetores da doença criados em buracos de árvores<sup>1</sup>.

O vírus da FA é mantido na natureza pela transmissão entre primatas não humanos e mosquitos hematófagos, além da transmissão transovariana entre esses vetores artrópodes<sup>1</sup>.

O homem é infectado esporadicamente pela picada de mosquito silvestre alimentado de sangue de macaco virêmico, caso em que temos a conhecida FA silvestre. Entretanto, o homem também pode servir como hospedeiro do vírus para a transmissão inter-humana, principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti*: a então denominada FA urbana<sup>1</sup>. A figura adiante (1.1) apresenta os possíveis ciclos de transmissão do vírus da FA na África e na América do Sul<sup>13,14</sup>.

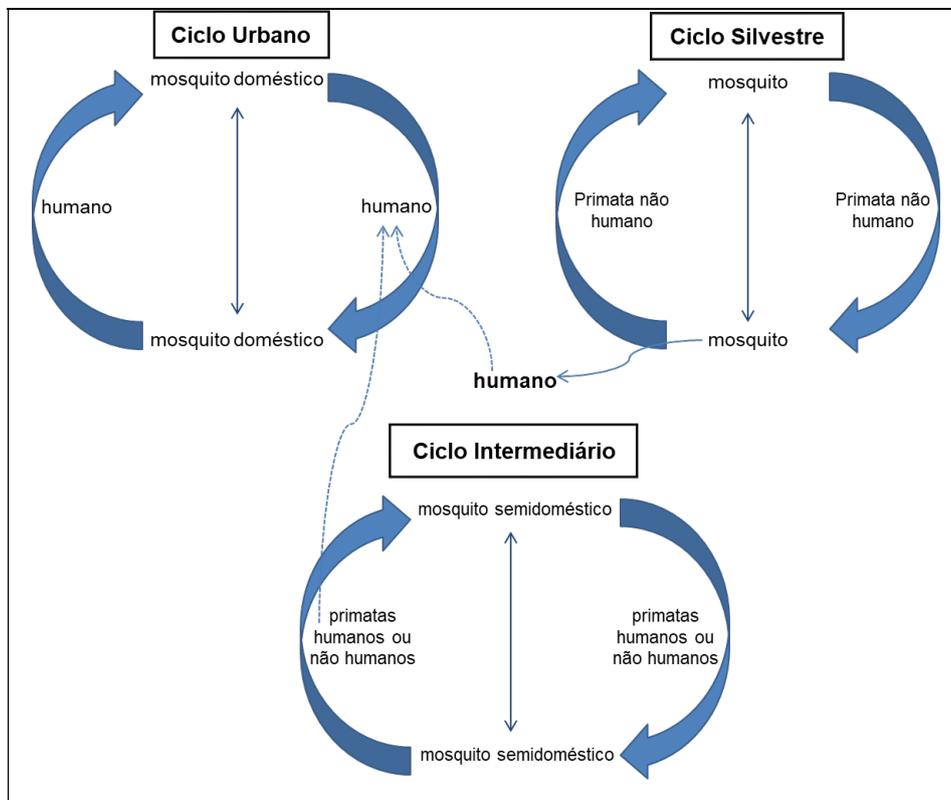
No ciclo silvestre, os vírus permanecem em mosquitos criados em buracos de árvores. A doença é transmitida entre macacos e outros pequenos primatas. Os humanos são infectados quando entram na floresta e são picados por mosquitos portadores do vírus. Em locais onde vetores silvestres estão presentes em alta densidade, como na zona de savanas da África, os seres humanos podem servir como o hospedeiro principal na transmissão epidêmica<sup>13,14</sup>.

No ciclo urbano, o mosquito doméstico infectado, o *A. aegypti*, transmite o vírus diretamente de humano para humano. Durante a estação seca, o vírus é mantido pela transmissão transovariana entre os mosquitos. Ovos contendo vírus sobrevivem em buracos secos de árvores e mosquitos da progênie infecciosa eclodem quando as chuvas retornam<sup>13,14</sup>.

Nas savanas úmidas da África existe um ciclo intermediário envolvendo vetores artrópodes e seres humanos que vivem ou trabalham em áreas fronteiriças à floresta. Neste ciclo, o vírus pode ser transmitido de macaco para humano ou de humano para humano por meio de mosquitos infectados<sup>15</sup>.

Os mosquitos, além de transmissores, são reservatórios dos vírus, pois, uma vez infectados, assim permanecem por toda a vida. Os principais vetores do vírus da FA na África são mosquitos do gênero *Aedes*: *A. aegypti* (ciclo urbano), *A. africanus*, *A. opok*, *A. luteocephalus*, *A. simpsoni*, *A. furcifer* e *A. taylori* (ciclo silvestre). Na América do Sul, além do *A. aegypti* no ciclo urbano, mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* são responsáveis pela transmissão da arbovirose no ciclo silvestre, tais como: *H. janthinomys*, *H. albomaculatus*, *H. leucocelaenus*, *S. chloropterus*, *S. soperi* e *S. cyaneus*<sup>16,17</sup>. O ciclo intermediário, exclusivo das savanas africanas, é mantido por diferentes espécies do gênero *Aedes*: *A. furcifer*, *A. taylori*, *A.*

*luteocephalus*, *A. africanus*, *A. opok*, *A. vittatus* e *A. Metallicus* (no oeste africano); *A. bromeliae* e *A. africanus* (no leste africano)<sup>14</sup>.



**Figura 1.1: Ciclos de transmissão do vírus da FA.**

No ciclo urbano, mosquitos *Aedes aegypti* são os vetores da FA tanto na África quanto na América do Sul. O ciclo silvestre tem como principais vetores o *Aedes africanus* (África) e diferentes espécies dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* (América do Sul). O ciclo intermediário é mantido por diferentes espécies (semidomésticas) do gênero *Aedes*. A transmissão transovariana (indicada por setas verticais) se dá pela infecção de tecidos reprodutivos do mosquito, possibilitando a transmissão vertical do vírus do mosquito fêmea para a sua progênie e de machos infectados congenitamente para fêmeas durante a cópula. Adaptado de "Centers for Disease Control and Prevention"<sup>15</sup>.

Os hospedeiros silvestres primários do vírus da FA, tanto na África quanto na América do Sul, são primatas não humanos, em especial macacos. Aqueles que ficam nas copas das árvores da floresta como, por exemplo, *Cercopithecus mitis*, são os principais hospedeiros vertebrados no ciclo silvestre, enquanto os que descem ao nível do solo (como do gênero *Cercocebus*) ou passam da floresta para as plantações (como *Cercopithecus aethiops*) são o elo entre o ciclo silvestre e o homem<sup>14</sup>. Embora

a transmissão inter-humana ocorra, a força desta interação é relativamente baixa, refletindo a certa escassez de casos em humanos<sup>1</sup>.

Mosquitos são infectados ao se alimentarem de hospedeiros durante o período virêmico, quando o vírus é circulante no sangue. A viremia desenvolvida por humanos dura cerca de sete dias, enquanto, em macacos, costuma ser mais curta, geralmente de dois a cinco dias. Primatas humanos e não humanos, após a infecção, morrem ou curam-se, caso em que ficam imunes à FA<sup>14</sup>.

Quase todas as espécies de primatas não humanos africanos apresentam infecção virêmica inaparente, evidenciando a origem do vírus da FA na África há milhares de anos e uma coevolução equilibrada do vírus e seus hospedeiros<sup>18</sup>. Por outro lado, alguns macacos do Novo Mundo, notavelmente *Alouatta*, são suscetíveis a infecções letais e epizootias associadas com macacos mortos podem preceder a ocorrência de casos humanos, uma ferramenta de vigilância útil<sup>19</sup>.

O vírus da FA foi responsável por inúmeras epidemias nas Américas, África e parte da Europa da metade do século XVII ao início do século XX, com taxas de letalidade, muitas vezes, acima dos 20%<sup>12,20</sup>.

A identificação do agente transmissor e a implementação de medidas de controle do mosquito vetor, seguidas do desenvolvimento e disponibilidade de vacinas vivas atenuadas a partir do final da década de 1930, tiveram impacto significativo na incidência de FA, resultando na ausência virtual da doença na América do Norte e Europa. No entanto, a FA permanece endêmica em muitas regiões tropicais da África e América do Sul, onde cocircula com outros *Flavivirus*, como o vírus da dengue. Periodicamente, ocorrem surtos isolados ou epidemias da doença nas áreas endêmicas, as quais podem ter maior ou menor impacto na saúde pública<sup>12,20</sup>.

Quarenta e sete países – 34 na África e 13 nas Américas Central e do Sul – são considerados endêmicos ou têm regiões endêmicas para FA. Estudo de modelagem baseado em fontes de dados africanas estimou a ocorrência de 84.000 a 170.000 casos graves e 29.000 a 60.000 mortes por FA em todo o mundo no ano de 2013<sup>21</sup>.

A FA é endêmica em regiões tropicais e subtropicais da África. Uma consideração da distribuição geoespacial e temporal de casos durante a era após 1960 (quando a vacinação foi cessada em países francófonos) forneceu as seguintes conclusões gerais: (I) surtos ocorrem com maior frequência na África ocidental do que em outras regiões africanas; (II) grandes epidemias são relatadas do oeste ao leste

da África, mas infrequentes e pequenas na África central; (III) há uma periodicidade de atividade da FA, com explosões em intervalos altamente irregulares de 5 a 20 anos na África ocidental e intervalos muito mais longos (45 anos, por exemplo) em partes da África oriental; (IV) algumas áreas têm sustentado epidemias por vários anos como, por exemplo, Gana (1977-1983), Guiné (2000-2005) e Nigéria (1986-1994); e (V) há anos de intensificação de atividade do vírus da FA em vários países e regiões geográficas da África, tal como em 1987 e em 2005, envolvendo múltiplas linhagens virais e diferentes espécies de vetores<sup>1</sup>.

A taxa anual de notificações na África tem variado bastante, com a ausência virtual de casos relatados em alguns anos para mais de 5000 casos. Desde 2008, atividades de vigilância baseadas em dados laboratoriais sugerem que, dos milhares de casos clínicos suspeitos investigados na África, somente 1-2% apresentam evidência laboratorial para FA<sup>1</sup>.

A vigilância naquele continente tem sido intensificada desde 2002, quando se formou uma rede de laboratórios nacionais de diagnóstico e um sistema de investigação de casos, responsável por identificar surtos e organizar campanhas de vacinação com o propósito de controlar a propagação da doença<sup>1</sup>.

Assim, com o aprimoramento da vigilância, relatórios e disponibilidade de laboratórios de diagnóstico, questionam-se as estimativas anteriores de carga endêmica de 130.000<sup>22</sup> a 200.000<sup>23</sup> casos de FA na África, porquanto provavelmente subestimadas<sup>1</sup>.

A partir de 2008, um maior número de casos passou a ser relatado em países da África Central, como República Centro-Africana, República Democrática do Congo e Chade. Muitos desses países raramente registraram casos de FA no passado. Mas não está claro se os registros recentes se devem à melhora na vigilância, ao aumento da atividade da doença naqueles locais ou a uma extensão das áreas vizinhas<sup>1</sup>.

Em 2010, uma epidemia foi reconhecida em Uganda pela primeira vez em 15 anos, a qual sinalizou o início do ressurgimento da FA nos países vizinhos, no Sudão e na Etiópia em 2013<sup>1</sup>. Em 2016, novo surto foi registrado em Uganda, sendo o primeiro relato nas áreas do sul do país, passando a indicar que todo o país está em risco de epidemias da doença. Também em 2016, dois surtos de FA urbana – em Angola e na República Democrática do Congo – reafirmaram a ameaça da doença, resultando em 963 casos e 137 mortes confirmados em laboratórios (taxa de

letalidade de 14,2%). O último surto de FA em Angola fora relatado em Luanda no ano de 1988<sup>24</sup>.

A atividade epidêmica do vírus da FA vem sendo registrada em diversos territórios africanos. Considerando somente o presente século, 17 países notificaram casos da doença à Organização Mundial da Saúde (OMS): Uganda, Gana, Guiné, Sudão, Etiópia, Angola, República Democrática do Congo, Camarões, Chade, Senegal, Serra Leoa, Costa do Marfim, República Centro-Africana, Libéria, Burquina Faso, Togo e Mali<sup>25</sup>.

A força de infecção da FA na África é muito maior (geralmente de 20 a 30 vezes) do que na América do Sul, o que resulta em grandes epidemias naquele continente<sup>1</sup>. Por outro lado, os casos de fatalidade mais baixos na África (em torno dos 20%) do que na América do Sul (40-60%)<sup>26</sup> sugerem que fatores genéticos são determinantes para a letalidade da infecção. É possível, todavia, que esse percentual na África esteja subestimado, pois, como pacientes com FA grave costumam ser removidos dos hospitais pelos seus familiares, o desfecho da doença não é registrado<sup>1</sup>.

A vigilância de FA continua a ser um problema crítico de saúde pública na América do Sul e no Caribe, com registros contínuos da doença nessas regiões. Os surtos de FA que ocorreram no Brasil após o ano 2000 a partir de Minas gerais (epidemias registradas nos anos de 2001 e 2003) parecem seguir um caminho para as regiões Sul e Sudeste<sup>27</sup>, migrando de áreas endêmicas para áreas onde casos da doença não eram registrados há décadas e a vacina para a FA não era administrada rotineiramente, a indicar que a maioria da população local estava suscetível ao vírus<sup>28</sup>. Entre 1990 e 2003, 7 países sul-americanos notificaram casos de FA – Bolívia, Brasil, Colômbia, Guiana Francesa, Equador, Peru e Venezuela – onde foram registrados 2.457 casos com 1196 óbitos, letalidade de 48,7%<sup>29</sup>.

De 1997 até a primeira década do presente século, observou-se no Brasil intensa circulação do vírus da FA nos estados de Goiás e Pará, estendida para áreas em estados contíguos de Goiás e Mato Grosso do Sul. Posteriormente, casos começaram a ser identificados fora da região endêmica e em países como Paraguai e Argentina entre os anos de 2007 e 2009, que não identificavam a circulação do vírus da FA havia 34 e 41 anos, respectivamente<sup>1</sup>.

No Brasil, a expansão da FA em 2008-2009 foi impressionante. O surto no estado de São Paulo em 2009 (com 28 casos e 11 óbitos) foi caracterizado pela

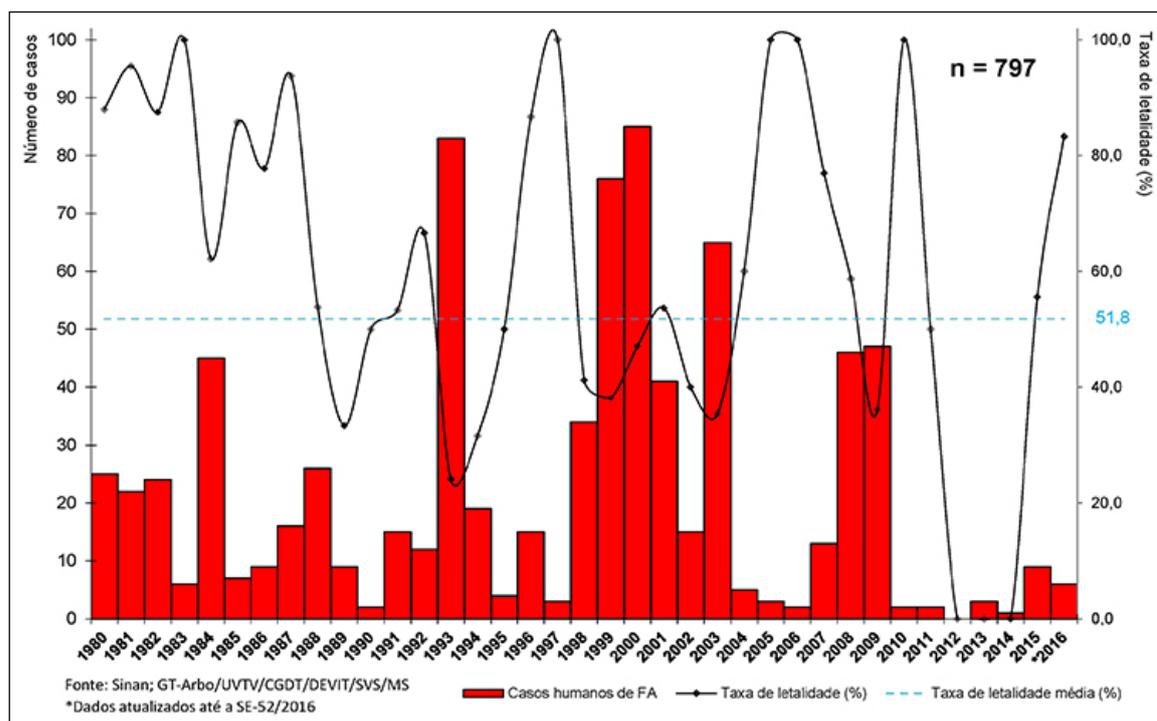
recuperação do vírus de áreas consideradas livres de sua circulação e sem recomendação para a vacinação, e a menos de 100 km da cidade de São Paulo, com aproximadamente 16 milhões de pessoas, em sua grande maioria não vacinada<sup>1</sup>.

No Rio Grande do Sul, a circulação epizootica foi observada em 2008 e 2009, quando registrada a morte de milhares de macacos, principalmente *Alouatta caraya*. Isso ocorreu quase ao mesmo tempo em que a transmissão da FA foi documentada na Argentina e no Paraguai. Casos relatados na área metropolitana da capital paraguaia Assunção representaram o segundo episódio de FA urbana na América do Sul desde o início da década de 1940<sup>1</sup>. Na Argentina, foi descoberto um novo vetor (*Sabethes albiprivus*) na transmissão da doença<sup>30</sup>.

Em 2016, um total de 110 casos confirmados de FA com 31 mortes (taxa de letalidade de 28,2%) foram relatados em 3 países sul-americanos endêmicos para a doença: Brasil (41 casos), Colômbia (7 casos) e Peru (62 casos). Em primatas não humanos, 24 epizootias devido ao vírus amarelo foram confirmadas naquele ano. De julho de 2014 a 2016, 6 estados brasileiros (Pará, Tocantins, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais e São Paulo) registraram 163 epizootias confirmadas de FA<sup>31</sup>.

No Brasil, entre dezembro de 2016 e 31 de maio de 2017, foram confirmados, para FA, 642 casos em primatas não humanos e 792 casos em humanos, com 274 óbitos (taxa de letalidade de 34,6%), em 9 estados brasileiros, na sua maior parte concentrados na região sudeste<sup>31</sup>. Estes registros revelam as maiores e mais devastadoras epizootia e epidemia de FA silvestre registradas no Brasil nos últimos 50 anos, um cenário inesperado que também foi observado nas ondas epizooticas/epidêmicas da doença no Brasil entre as décadas 1930 e 1940<sup>28,32</sup>. Os registros do surto de 2016/2017 correspondem ao número total de casos confirmados para FA em humanos, em todo o Brasil, entre os anos de 1980 e 2015<sup>33</sup>, como podemos observar na figura 1.2, exposta adiante.

Após a temporada de inverno de 2017 no Brasil, observou-se novamente uma maior atividade do vírus da FA. Entre 1º de julho de 2017 e 28 de fevereiro de 2018, 4.161 epizootias entre primatas não humanos foram relatados, dos quais 554 foram confirmados em laboratório<sup>34</sup>. No mesmo período, 723 casos de FA em humanos foram confirmados no país, sendo que em 237 deles ocorreu o óbito. Ao todo, foram notificados, no período, 2.867 casos suspeitos, sendo que 1.359 foram descartados e 785 permanecem em investigação<sup>35</sup>.



**Figura 1.2: Série histórica do número de casos humanos confirmados de FA silvestre e a letalidade no Brasil, 1980 a 2016.**

Os dados do gráfico estão atualizados até os 6 casos confirmados da doença para o ano de 2016 (5 casos entre janeiro e maio e 1 caso em dezembro). Portanto, foram 791 casos confirmados de FA entre os anos de 1980 e 2015; praticamente o mesmo total registrado de casos confirmados no surto de 2016/2017 do país (792 casos entre dezembro de 2016 e maio de 2017). Fonte: Ministério da Saúde<sup>33</sup>.

O potencial para o ressurgimento continuado da FA em países endêmicos e a emergência em novas áreas sugerem que mais estudos clínicos e epidemiológicos devem ser realizados para definir e entender melhor o risco global de saúde pública da infecção e doença causada pelo arbovírus<sup>12</sup>.

O número de casos de FA tem aumentado ao longo das últimas duas décadas devido à diminuição da imunidade da população à infecção, às alterações climáticas, aos desmatamentos, à urbanização e ao aumento dos movimentos da população<sup>21</sup>.

A OMS trata apropriadamente a detecção de um caso de FA como uma emergência, uma vez que reflete a transmissão do vírus e o risco de uma propagação futura. Caso a região afetada seja uma área de baixa cobertura vacinal, geralmente uma campanha de vacinação em massa regional é conduzida em resposta<sup>36</sup>.

Apesar da disponibilidade de vacinas desde a década de 1940, grandes epidemias vem ocorrendo em áreas sem experiência de imunidade artificial ou naturalmente adquirida – como as da década de 1960 e final da década de 1980 na África, envolvendo mais de 100.000 casos<sup>1</sup>, e surtos mais recentes, como o já mencionado no Brasil em 2016/2017. De 2006 a 2016, 227 eventos de FA foram relatados em 19 países na África (83% dos casos) e 7 nas Américas (8% dos casos), em locais onde, de 1980 a 2005, nunca haviam sido registrados casos da doença, indicando que a circulação do vírus expandiu para áreas não consideradas de alto risco anteriormente. A mudança é atribuída especialmente ao sucesso das campanhas de vacinação em massa em países de alto risco para a FA (principalmente países da África ocidental)<sup>24</sup>.

Perturbações no clima, sobretudo o aumento prolongado das chuvas e as temperaturas altas, têm sido associados com surtos de FA na África e América do Sul<sup>1</sup>. Uma estação chuvosa grave e prolongada é associada com abundância de vetores e pode ser agregado ao aumento da circulação do vírus da FA. Exemplos claros são os ocorridos na Nigéria em 1987 e no Brasil (no estado de Goiás) em 2000. Neste último, a chuva excessiva e o aumento de 2°C na temperatura média foram seguidos por um número expressivo de epizootias com muitos macacos mortos relatados e, quase simultaneamente, a ocorrência de casos humanos<sup>37</sup>. Desordens similares de pluviosidade foram responsáveis pela propagação e amplificação do vírus nos estados de São Paulo<sup>38</sup> e Rio Grande do Sul em 2007<sup>39</sup>.

Desmatamentos para uso do solo, especialmente para agricultura e criação de gado, têm sido relacionados a emergências de surtos de FA devido à atividade resultante de corte ao nível do solo do dossel vegetativo dos vetores que o habitam. Isso é importante para a infecção em assentamentos novos dentro ou próximos à floresta. O desmatamento relacionado à serração e à exportação de madeira tem também resultado em uma emergência de surtos em áreas endêmicas<sup>1</sup>.

A colonização de áreas dentro da zona endêmica pela população de migrantes não vacinados tem sido representativa para uma proporção alta de casos de FA na América do Sul. No Peru, nos anos da década de 1990, um aumento considerável nos casos de FA foi diretamente associado com a migração de áreas costeiras ou montanhosas para a região amazônica<sup>1</sup>.

Apesar dessas evidências, cabe enfatizar que as interações complexas entre vírus, vetor, hospedeiro, clima e o ambiente permanecem superficialmente

compreendidos, em grande parte, devido à senescência de programas de pesquisa de campo longitudinais. Mais estudos sobre a expansão cíclica e a retração da circulação do vírus da FA são necessários para definir os fatores fundamentais para a emergência da FA<sup>1</sup>.

O aumento da atividade viral contribui para a preocupação internacional crescente de que o vírus amarelo pode se espalhar para países asiáticos<sup>24</sup>. A contínua ausência do vírus da FA nas regiões central e sudeste da Ásia, apesar da presença de vetores apropriados e hospedeiros reservatórios, permanece inexplicável. Mas se acredita numa combinação de fatores<sup>12</sup>.

Historicamente, é provável que poucas oportunidades de introdução do vírus nesta região tenham ocorrido, tanto de origem africana como sul-americana. Exigências atuais para viajantes de áreas endêmicas se vacinarem previamente reforçam a probabilidade baixa de introdução. A competição com os vírus da dengue e outros *Flavivirus* por mosquitos vetores e a possibilidade de imunidade preexistente para outras arboviroses podem também dificultar o estabelecimento dos ciclos de transmissão da FA naquele continente. Mas, uma vez que hospedeiros susceptíveis de primatas não humanos estão presentes em muitas regiões da Ásia, possível que surtos de FA ocorram, permitindo que o vírus se estabeleça lá futuramente em um ciclo silvestre<sup>12</sup>.

Vários estudos comparam as sequências do genoma completo ou parcial das cepas africanas do vírus da FA. As conclusões gerais são consistentes: (I) os genótipos da América do Sul são derivados de cepas da África ocidental e divergiram ao longo do tempo do tráfico de escravos<sup>18</sup>; (II) existem 5 grandes genótipos na África representando regiões geográficas discretas, mas sobrepostas no continente; (III) o genótipo do leste africano é o mais divergente; (IV) existe uma micro-heterogeneidade considerável, de modo que, dentro de uma região, vários clados podem ser distinguidos; e (V) modelos de relógio filogenético mostram dispersão em intervalos discretos em um tempo bastante recente<sup>1</sup>.

Os 5 principais genótipos africanos são: “West Africa I” (ou “West/Africa”), representando cepas da Nigéria, Camarões e Gabão; “West Africa II” (ou “West”), correspondendo a cepas do Senegal, Gâmbia, Guiné, Gana e Costa do Marfim; “East Africa”, representando cepas de Uganda e Sudão; “East/Central Africa”, caracterizada pelas cepas da República Centro-Africana, República Democrática do Congo e Etiópia; e o genótipo Angola<sup>1</sup>. Essas linhagens têm seus genomas diferenciados em

aproximadamente 10-23% em nível de nucleotídeo, com a maior diversidade notada entre “East Africa” e “East/Central Africa” comparadas às linhagens “West Africa I” e “West Africa II”<sup>40-43</sup>.

O antecessor comum de todas as linhagens emergiu entre 700 e 1200 anos antes do genótipo definido mais recentemente<sup>18,44,45</sup>. As linhagens africanas do oeste e do leste parecem ter divergido pela dispersão a partir da África central. As linhagens periféricas (“West Africa II” e “East Africa”) parecem ter surgido mais recentemente, indicando uma dispersão do vírus para o exterior. Assim, a linhagem “West Africa I” apresenta mais heterogeneidade do que a “West Africa II”<sup>40</sup>. Uma vez que múltiplas cepas têm sido avaliadas ao longo do tempo na mesma região<sup>43</sup>, os dados suportam o conceito de que o vírus da FA circula em focos discretos, com emergências periódicas limitadas por corredores acessíveis contendo vetores e hospedeiros<sup>1</sup>.

Poucas emergências de FA têm sido caracterizadas com relação ao genótipo envolvido na transmissão, geralmente porque as cepas virais não são preservadas para estudos. No entanto, a existência de dados moleculares permite algumas percepções na epidemiologia de FA. Duas linhagens cocirculam em áreas como Burquina Faso, onde “West Africa II” e “West Africa I” foram associados aos surtos de 1983 e 1985, respectivamente. Isolados de “West Africa I” têm aparecido ocasionalmente em países distantes como Costa do Marfim e Senegal. Uma emergência importante de FA em 1987 foi associada com grandes surtos simultâneos na Nigéria e Mali causados por dois genótipos (“West Africa I” e “West Africa II”, respectivamente), indicando fatores coincidentes favorecendo a transmissão em dois focos distintos. Na África oriental, tanto a cepa “East Africa” quanto a “East/Central Africa” têm emergido em Uganda e no Sudão<sup>1</sup>. Durante 2011 e 2012, grandes epidemias de FA ocorreram nesses países, além de casos relatados oriundos de Camarões, Chade e Costa do Marfim<sup>46</sup>.

Os genótipos sul-americanos – “South America I” e “South America II” – aparentemente surgiram da introdução de cepas do oeste africano no Brasil há aproximadamente 400 anos, durante o tráfico de escravos<sup>18,47,48</sup>. Estes genótipos diferem entre si em cerca de 5% e dos africanos em até 16%, considerando a sequência de nucleotídeos. Análises filogeográficas das cepas sul-americanas indicam que a maior parte da dispersão do vírus amarelo nas Américas ocorreu nos últimos 50 anos<sup>48</sup>. Subclados específicos foram identificados dentro de cada genótipo e estudos epidemiológicos moleculares de isolados do Brasil e Peru evidenciaram

diferenças na distribuição geográfica dos subclados ao longo do tempo<sup>49,50</sup>, diferenças essas também atribuídas a modos variados de manutenção e transmissão do vírus da FA nesses dois países<sup>12</sup>.

Estudos prévios sustentam que os genótipos americanos do vírus da FA têm se diversificado em várias linhagens enzoóticas concorrentes que parecem persistir e evoluir em áreas geográficas distintas do Brasil, Bolívia, Peru, Trinidad e Tobago e Venezuela por longos períodos de tempo<sup>38,47,50-53</sup>. Enquanto a evolução *in situ* parece ser o mecanismo predominante de manutenção do vírus da FA na América do Sul e no Caribe, alguns estudos detectaram migrações ocasionais do vírus entre diferentes países americanos ao longo dos anos<sup>47,53</sup> e outros mostraram que surtos da doença estavam associados com o surgimento de linhagens novas que substituíram as que causaram surtos anteriores, como observado em epidemias brasileiras mais recentes<sup>38,50</sup>. Estas observações sugerem que a reintrodução e a substituição de linhagem podem ter sido fatores importantes que moldaram a evolução em longo prazo e o surgimento de novos surtos da FA nas Américas<sup>28</sup>.

“South America I” é o genótipo mais frequentemente registrado no Brasil<sup>1,48</sup>. Cinco linhagens foram reconhecidas a partir deste genótipo – nomeadas 1A a 1E – as quais foram associadas com registros epidêmicos durante expansões cíclicas e retrações da circulação do vírus da FA no Brasil e em outros países tropicais americanos<sup>38,50</sup>. Desde a virada do século, as linhagens 1D e 1E têm sido encontradas no Brasil<sup>38,48</sup>.

A linhagem 1D foi responsável por todos os casos registrados da doença entre os anos de 1998 e 2000 no Brasil. O genótipo foi isolado simultaneamente no norte (Pará), nordeste (Bahia) e sudeste (Minas Gerais e São Paulo). Sendo inviável atribuir a propagação do vírus ao movimento de populações de macacos, em vista da enorme distância, de mais de 2000 quilômetros, que separam o Pará dos Estados do Sudeste, os autores propuseram que migrantes virêmicos carregaram o vírus para áreas novas, estabelecendo a transmissão epizootica local<sup>50</sup>.

O surto registrado no Brasil de 2016/2017 parece ter sido causado pela linhagem 1E do vírus amarelado. Bonaldo e colaboradores<sup>54</sup> realizaram o sequenciamento total dos genomas virais obtidos de duas amostras de macacos (*Alouatta clamitans*) naturalmente infectados, em 2017, no estado do Espírito Santo. As análises dos dados revelaram que as sequências eram idênticas e pertencentes ao subclado 1E do genótipo “South America I”, assim como outras cepas detectadas

anteriormente no Brasil (em 2002, 2004 e 2008) e na Venezuela (em 1998, 2005-2007 e 2010). Os autores sugerem que as mudanças detectadas em 8 aminoácidos de proteínas virais podem ter impactado na capacidade de infecção viral em hospedeiros vertebrados e/ou invertebrados e na grande propagação desse surto<sup>54</sup>.

Havia um senso comum de que mais dados são necessários para determinar se diferenças observadas na virulência para cepas de FA extrapolam para diferenças entre os genótipos e/ou subclados principais<sup>12</sup>.

### **1.1.3 O Vírus**

A FA é causada por arbovírus do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*<sup>55</sup>. O termo arbovírus não é um indicador taxonômico, mas é o requisito para um vetor no seu ciclo de transmissão<sup>56</sup>. Arbovírus são transmitidos entre artrópodes (tais como mosquitos e carrapatos) e hospedeiros vertebrados durante o ciclo de vida do vírus. Muitos são considerados zoonóticos, ou seja, transmissíveis de animais para humanos, como o vírus da FA<sup>57</sup>. Diferenças nas características morfológicas, antigênicas, bioquímicas e genéticas são utilizadas para separar os arbovírus em família, gênero, subgrupos, complexos antigênicos, espécie, subtipos e variedades em uma ordem crescente de parentesco<sup>58</sup>.

A família *Flaviviridae* é atualmente composta por quatro gêneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pestivirus* e o recém-proposto gênero *Pegivirus*<sup>59</sup>. Apesar da ampla divergência entre esses vírus, eles compartilham semelhanças importantes na estrutura do genoma, morfologia do virion e ciclo de vida<sup>60</sup>.

O gênero *Flavivirus* contém 53 espécies, integrando importantes patógenos virais humanos além do vírus da FA (protótipo do gênero), como os vírus da dengue, do oeste do Nilo, da zika e encefalite japonesa, que são arbovírus<sup>10,61</sup>.

Há duas propriedades biológicas inerentes ao vírus da FA: viscerotropismo – referente à habilidade de causar viremia e infectar e danificar fígado, baço, coração, rins – e neurotropismo – habilidade de infectar o parênquima cerebral e causar encefalite. As cepas selvagens do vírus da FA são predominantemente viscerotrópicas em hospedeiros primatas. Findlay e Stern observaram que mesmo após inoculação viral intracerebral em espécies susceptíveis de primatas não humanos, a morte é devido à hepatite em vez de encefalite. No entanto, o animal

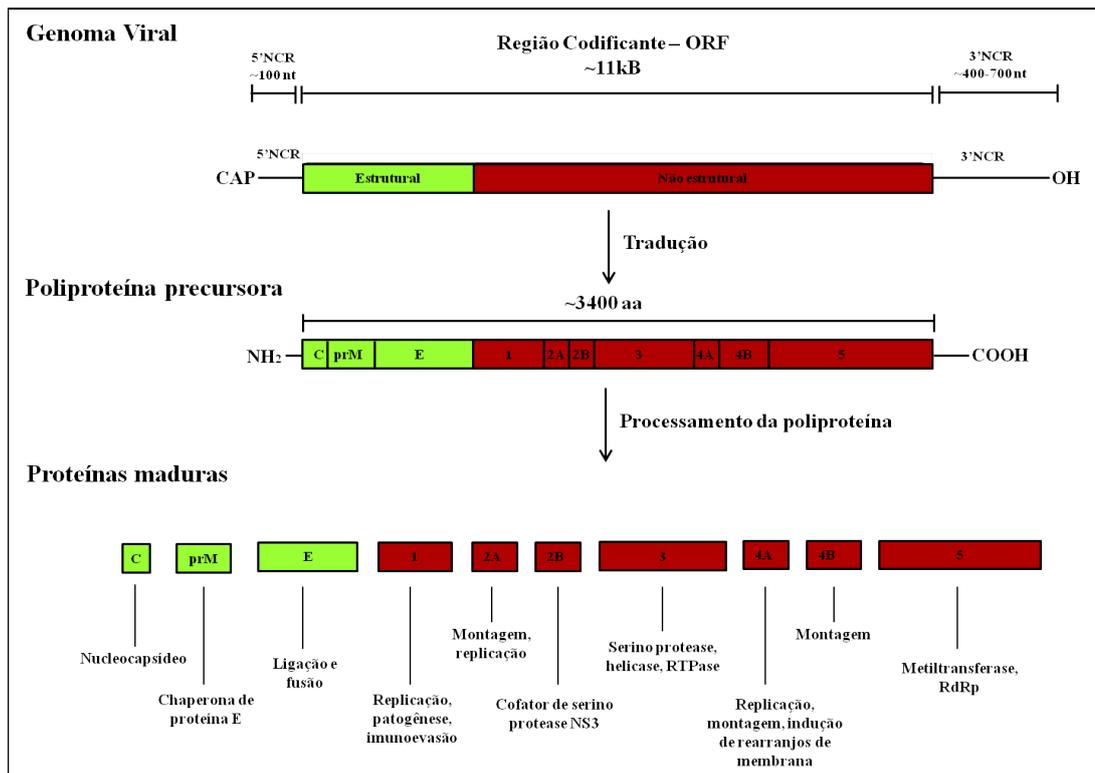
morre de encefalite quando uma pequena quantidade de anticorpo é dada ao macaco um pouco antes ou ao mesmo tempo em que o vírus é injetado pela via intracerebral<sup>62</sup>, provavelmente porque o anticorpo é capaz de proteger órgãos periféricos, mas não o cérebro<sup>2</sup>.

O genoma do vírus da FA (figura 1.3) é uma molécula de RNA fita simples não segmentado, de polaridade positiva, com 10.760 a 11.008 nucleotídeos, apresentando uma única fase de leitura aberta (ORF, do inglês "Open Reading Frame") para a síntese das proteínas virais estruturais e não estruturais. A ORF é flanqueada por duas regiões não codificantes (NCR, do inglês "non-coding region") de tamanhos variáveis: uma estrutura CAP na extremidade 5' e uma extremidade 3' não poliadenilada<sup>12</sup>. As NCRs, embora não codifiquem a formação das proteínas virais, são importantes para a regulação e expressão do vírus. Estruturas secundárias presentes nessas regiões são essenciais para o início da tradução e replicação do RNA viral<sup>63-65</sup>.

A estrutura 3'NCR do genoma viral compreende três regiões ou domínios distintos designados I, II e III a partir da extremidade proximal da NCR<sup>66,67</sup>. O domínio III inclui uma estrutura LSH (do inglês "long stable hairpin"), com aproximadamente 90 nucleotídeos de comprimento, altamente conservada em todos os *Flavivirus* e requerida para a viabilidade do vírus, enquanto que outras estruturas secundárias nesta região modulam a eficiência de replicação do genoma, mas podem não ser essenciais<sup>68</sup>.

A extremidade 5'NCR tem um tamanho bastante semelhante para as diferentes cepas do vírus da FA e a maioria dos outros *Flavivirus* (aproximadamente 100 nucleotídeos), enquanto a extremidade 3'NCR apresenta dimensão altamente variável (406 a 654 nucleotídeos)<sup>65</sup>.

A tradução da ORF resulta na síntese de uma única poliproteína precursora com cerca de 3400 aminoácidos (figura 1.3). Esta é subsequentemente clivada por enzimas da célula hospedeira e um complexo de protease derivado do vírus para produzir as 10 proteínas virais individuais: 3 estruturais (codificadas pelo quarto 5' do genoma) e 7 não estruturais (NS, do inglês "non-structural")<sup>12</sup>.



**Figura 1.3: Organização do genoma e funções das proteínas virais de *Flavivirus*.**

A única região codificante (ORF) resulta em uma poliproteína precursora a qual sofre clivagens co- e pós-traducionais, gerando 3 proteínas estruturais (em verde) e 7 não estruturais (em vermelho). As funções assumidas destas proteínas são descritas. NCR, região não codificante; nt, nucleotídeos; kB, kilobases; aa, aminoácidos; C, proteína de capsídeo; prM, proteína precursora de membrana; E, proteína de envelope; RdRp, RNA polimerase RNA-dependente. Adaptado de Fernandez-Garcia et al 2009<sup>69</sup>.

As proteínas estruturais – C (do capsídeo), prM/M (de membrana e sua precursora) e E (do envelope) – constituem a estrutura básica da partícula viral juntamente com o seu genoma, enquanto as proteínas NS – NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 – são envolvidas na replicação do RNA viral, montagem do vírus e modulação das respostas da célula hospedeira<sup>65</sup>.

O capsídeo, de simetria icosaédrica, empacota a cópia única de RNA viral, formando o nucleocapsídeo com cerca de 25-40nm de diâmetro<sup>12</sup>. O nucleocapsídeo é coberto pelo envelope, um envoltório bilaminar de natureza lipoprotéica originário da célula hospedeira, onde são inseridas as proteínas transmembranares E e M<sup>16</sup>.

A proteína M é um pequeno fragmento proteolítico da sua forma precursora prM e está ancorada na membrana viral por duas hélices transmembranares<sup>70,71</sup>. As proteínas E são dinâmicas, adotando conformações e arranjos diversos na partícula do vírus<sup>72,73</sup>. A proteína E na sua forma dimérica madura (53 kDa) é o principal

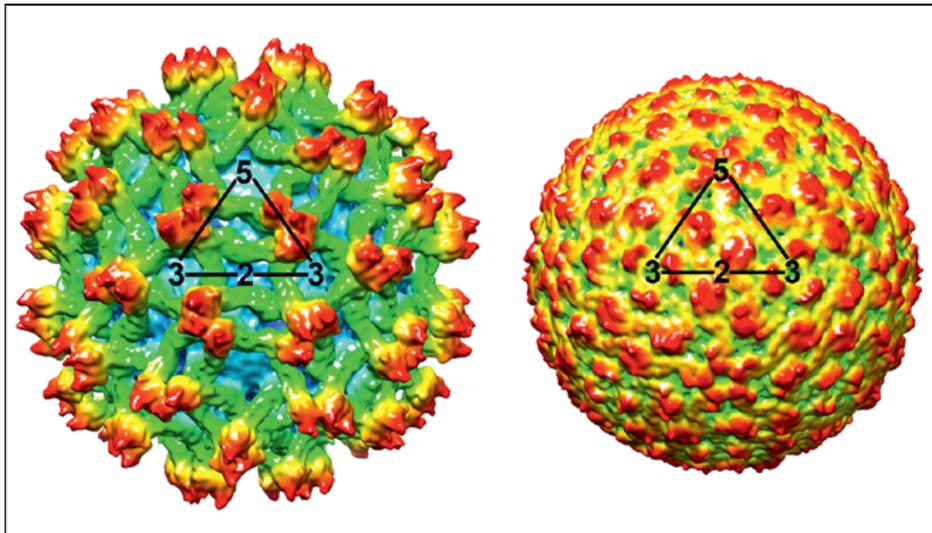
componente superficial do virion, sendo competente para a ligação à superfície celular, fusão e entrada dos vírus na célula hospedeira<sup>74</sup>, além de possivelmente ser importante para a evasão imunológica durante o ciclo de vida dos *Flavivirus*. Ademais, é o principal alvo para a neutralização de anticorpos antinflavivirus<sup>75</sup>.

São reconhecidas duas formas de virion (figura 1.4): a madura contém a proteína M, enquanto a forma imatura, não infecciosa, contém a precursora prM. Os virions maduros de *Flavivirus* são partículas esféricas de aproximadamente 50nm de diâmetro<sup>12</sup>.

A microscopia crioeletrônica tem revelado estruturas tridimensionais de vários *Flavivirus*, incluindo as do vírus da FA, onde é possível observar o tamanho e a disposição gerais do virion nas formas madura e imatura. No virion maduro não há interação das proteínas E e M com o nucleocapsídeo, e os dímeros da proteína E são cuidadosamente embalados em um arranjo de "espinha de peixe" paralelamente à membrana lipídica, dando ao virion uma superfície relativamente lisa. Nas células infectadas, os virions são inicialmente reunidos na forma imatura com uma organização estrutural consideravelmente distinta. Nessas partículas, a glicoproteína E está associada à prM (prM-E) e três desses heterodímeros formam uma espícula viral, a qual se projeta da superfície do vírus<sup>70-72</sup>.

Além das três proteínas estruturais, o genoma do vírus amarelo codifica sete proteínas NS, numeradas por ordem de síntese de 1 a 5, envolvidas na replicação viral. Algumas destas proteínas também interagem com proteínas da célula hospedeira para modular respostas à infecção viral<sup>12</sup>.

As proteínas NS mais conhecidas são a NS3 (70 kDa) e NS5 (104 kDa), com múltiplas atividades enzimáticas importantes para a replicação viral. A NS3 é uma proteína multifuncional atuando como serino protease juntamente com o cofator NS2B para mediar clivagens dentro da poliproteína traduzida, além de desempenhar papel crucial durante a replicação de RNA viral por possuir atividades de helicase/NTPase (Nucleosil Trifosfato Hidrolase) e RNA 5' trifosfatase (RTPase)<sup>76-80</sup>.



**Figura 1.4: Formas das partículas virais.**

Reconstruções tridimensionais microscópicas de partículas imaturas (esquerda) e maduras (direita) de um isolado de vírus da dengue, uma espécie do gênero *Flavivirus*. Representação superficial do vírus da dengue imaturo na resolução de 12.5Å (esquerda) e a mesma espécie viral madura na resolução 10Å (direita). Triângulos descrevem uma unidade icosaédrica. Fonte: "International Committee on Taxonomy of Viruses 2017" (ICTV)<sup>81</sup>

NS5 é a maior e a mais altamente conservada proteína de *Flavivirus*, com duas distintas atividades enzimáticas separadas por uma região interdomínio: uma metiltransferase no seu N-terminal<sup>82,83</sup> e uma RNA polimerase RNA-dependente (RdRp) no seu C-terminal<sup>84-88</sup>. Entre as proteínas NS, as localizações e as sequências de NS3 e NS5, essenciais para o processamento da poliproteína e a replicação do RNA, são relativamente bem conservadas em toda a família e, portanto, são valiosas para análises filogenéticas<sup>60</sup>.

Dentro de células infectadas, a proteína NS1 (46 kDa) está associada com a forma replicativa de cadeia dupla do RNA viral<sup>89</sup> e, provavelmente, desempenha um papel importante nos eventos iniciais da replicação<sup>90</sup>. A NS1 de vírus amarelo e de outros *Flavivirus* também atua como antagonista de ativação de Complemento, podendo contribuir para a patogenicidade<sup>91</sup>.

As outras quatro proteínas NS (NS2A, NS2B, NS4A e NS4B) são pequenas e hidrofóbicas; participam da replicação viral e/ou funcionam como antagonistas da resposta imune inata do hospedeiro. NS2B (14 kDa) é um cofator requerido para a atividade proteolítica da protease NS3, enquanto NS2A (22 kDa) e NS4A (16 kDa) apresentam estreita associação com NS3 e NS5 no complexo de replicação viral,

além de estarem ligadas especificamente à extremidade 3'NCR do RNA viral<sup>92</sup>. NS4A e NS4B (27 kDa) podem desempenhar papéis na proliferação de membrana celular para suportar a replicação viral<sup>93-95</sup>. As proteínas NS pequenas, para alguns *Flavivirus*, parecem também funcionar como antagonistas de interferon<sup>96,97</sup>.

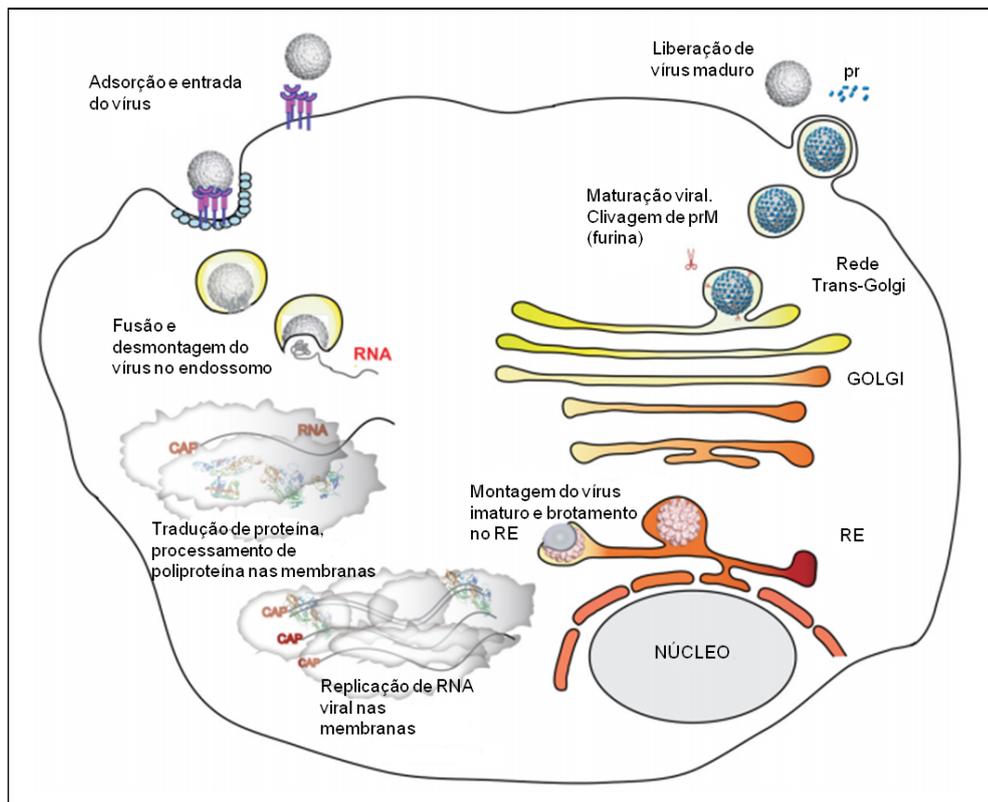
Células hospedeiras para infecção por *Flavivirus* incluem monócitos, macrófagos e células dendríticas<sup>98-102</sup>. A primeira etapa do ciclo de replicação deste gênero (figura 1.5) envolve a ligação/adsorção do virion à célula hospedeira por intermédio de múltiplos receptores celulares. Vários mecanismos de infecção celular têm sido descritos, incluindo endocitose do vírus em vesículas revestidas de clatrina mediada por receptores específicos de células de mamíferos<sup>103,104</sup>, fagocitose por monócitos/macrófagos<sup>105,106</sup> ou fusão com a membrana celular e entrada direta, como observado em células de mosquitos<sup>106</sup>.

A entrada do vírus seguida de acidificação endossomal induz mudanças estruturais na proteína E – a qual se rearranja de 90 homodímeros em pH neutro (virion maduro) para 60 homotrímeros em pH ácido (virion imaturo) – desencadeando a fusão das membranas viral e celular, seguida da liberação do nucleocapsídeo no citoplasma, onde ocorre a tradução do RNA genômico<sup>107-109</sup>.

A tradução do RNA gera uma poliproteína precursora que é processada pela serino protease codificada pelo vírus (NS2B/NS3) e pelas proteases codificadas pela célula hospedeira (sinalase e furina), produzindo as 10 proteínas estruturais e não estruturais do vírus<sup>61,110</sup>.

Após a tradução do RNA viral liberado, NS5 (RdRp) polimeriza RNA de senso negativo (complementar ao RNA genômico), servindo como modelo para a síntese de novo RNA viral de senso positivo<sup>111</sup>.

A replicação viral ocorre no retículo endoplasmático (RE) e em pacotes de vesículas (membranas derivadas do Golgi), os chamados complexos de replicação viral, os quais estão intimamente associados às membranas celulares e consistem de RNA e proteínas virais e, possivelmente, fatores da célula hospedeira<sup>112,113</sup>. O recém-sintetizado RNA é expulso no espaço intermembrana dos pacotes de vesículas de membrana dupla, saindo no citoplasma por um mecanismo desconhecido<sup>114</sup>.



**Figura 1.5: Desenho esquemático do ciclo de replicação dos *Flavivirus*.**

Virions se ligam a moléculas e receptores de adsorção de superfície celular e são internalizados por endocitose. Em pH baixo do endossomo, glicoproteínas virais medeiam a fusão das membranas celular e viral, permitindo a desmontagem do virion e a liberação do seu RNA no citoplasma. O RNA viral é traduzido em uma poliproteína que é processada por proteases celulares e virais. Proteínas NS do vírus replicam o RNA genômico. A montagem do virion ocorre na membrana do retículo endoplasmático (RE). Proteína do capsídeo e RNA viral são envelopados pela membrana e suas glicoproteínas para formar partículas virais imaturas, as quais são transportadas pela via secretória. No pH baixo da rede trans-Golgi, prM é clivada pela furina. Virions maduros são liberados no citoplasma. Adaptado de Sampath & Padmanabhan 2009<sup>61</sup>.

A montagem das partículas virais ocorre em estreita associação com o RE. A primeira etapa desse processo é o revestimento do recém-sintetizado RNA viral com a proteína C<sup>74,115</sup>. Em seguida, uma bicamada lipídica derivada do RE contendo heterodímeros de prM-E envelopa o nucleocapsídeo formando uma partícula viral imatura que brota do lúmen do RE rugoso no Golgi<sup>116</sup>.

A maturação das partículas virais ocorre durante o seu processo de saída da célula hospedeira, na rede trans-Golgi<sup>117</sup>, onde prM é clivada a M pela furina, junto com rearranjo conformacional da proteína E<sup>72,118,119</sup>.

A disposição de prM nos heterodímeros prM-E nas partículas imaturas impede a fusão prematura do vírus com a membrana celular durante seu transporte para fora

da célula. As partículas imaturas transitam em um ambiente do Golgi de baixo pH e uma mudança conformacional/morfológica reversível ocorre na proteína E antes do processamento de prM. A clivagem de prM a M pela serino protease celular (furina) na rede trans-Golgi resulta em uma mudança conformacional irreversível na proteína E<sup>118,119</sup>. Esta etapa é essencial para o vírus na transição de partículas virais não infecciosas, incapazes de fundir, a virions maduros, infecciosos, capazes de fundir. As partículas maduras são liberadas por exocitose para o meio extracelular<sup>61</sup>.

#### **1.1.4 Respostas Celular e Humoral do Hospedeiro ao Vírus**

Há poucos estudos de avaliação da resposta imune à infecção primária com o vírus da FA. A maioria das infecções só é identificada quando os pacientes estão em fase de doença hemorrágica fulminante ou até mesmo após a morte. Portanto, grande parte da informação relativa à imunidade em resposta à infecção com o vírus selvagem é de casos graves da doença e não da maioria, em que a resposta imune é eficaz no combate à infecção<sup>120</sup>. Alternativamente, a maior parte do conhecimento sobre as respostas imunes inata e adaptativa é obtida a partir de estudos em pacientes vacinados. A investigação dos genes ativados após a administração de vacinas 17D forneceu uma visão mais detalhada da interação de respostas inatas e adaptativas e elucidou assinaturas genéticas específicas correlacionadas com as respostas celular (linfócitos ou células T) e humoral (linfócitos ou células B e anticorpos)<sup>121–123</sup>.

A infecção com o vírus (ou a vacina da FA) é seguida de resposta imune rápida e específica. A imunidade inata, incluindo os TLRs (do inglês “Toll-like receptor”), as vias de ativação de sinal de inflamossoma e a produção de IFN (interferon) do tipo I (alfa e beta) são fundamentais para moldar e promover a resposta adaptativa. Uma resposta inata robusta é, provavelmente, a base de respostas adaptativas rápidas, fortes e duradouras ao vírus da FA e a sua vacina derivada<sup>2</sup>. Também é provável que pacientes com desfecho desfavorável possam ter defeitos nas respostas imunes inata e adaptativa que resultam em vírus ultrapassando a imunidade no início da infecção ou no desenvolvimento de respostas imunopatológicas durante os estágios

posteriores, onde uma resposta imune desregulada é caracterizada por uma apresentação excessiva de citocinas pró-inflamatórias<sup>11</sup>.

A imunidade inata atende a duas funções importantes: proporciona uma proteção relativamente imediata contra a infecção e estabelece um meio para promover a imunidade adaptativa subsequente (células T e B) e memória<sup>121,123</sup>.

Antes de 1998, a resposta celular em humanos à vacina 17D não tinha sido estudada<sup>124</sup>. Os linfócitos T CD4+ e T CD8+ respondem fortemente às cepas vacinais. A cinética das células T citotóxicas (CD8+) efectoras com atividade antiviral e as células T auxiliares (CD4+) com padrão Th1/Th2 misto parecem ser muito rápidas, começando durante a primeira semana após a infecção<sup>121,123,125,126</sup>. Células CD8+ ativadas são detectadas tão cedo quanto três dias pós-imunização<sup>127</sup>. As células T CD4+ têm pico entre 7 e 14 dias após a imunização<sup>128,129</sup>, enquanto as células T CD8+ atingem um pico entre 14 e 30 dias<sup>125,127,129-131</sup>.

A proliferação de células T CD8+ parece ser amplamente controlada por antígeno, uma vez que o tamanho da resposta das células T se correlaciona diretamente com a carga viral<sup>127</sup>. Os linfócitos T citotóxicos medeiam a morte de células infectadas por *Flavivirus* e são um importante mecanismo efector da remoção viral durante a infecção primária. As células CD8+ são polifuncionais (secretam múltiplas citocinas e enzimas efectoras), visam múltiplas proteínas e epítomos virais e apresentam forte memória<sup>130,132,133</sup>.

As células CD8+ específicas de 17D respondem a epítomos dentro de cada produto maduro da poliproteína vacinal produzindo várias citocinas, como as pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MIP1- $\beta$  e a citocina promotora de proliferação IL-2<sup>130,131</sup>. Quase todos os linfócitos T CD8+ específicos para 17D expressam granzima B, sugerindo que são funcionalmente capazes de degranular e, provavelmente, são citotóxicos<sup>130,134</sup>.

Os epítomos de células T citotóxicas foram localizados nas proteínas E, NS1, NS2B e NS3 da FA 17D e são conservados entre cepas do vírus do tipo selvagem<sup>132</sup>.

As células T CD8+, após o pico de expansão, começam a se diferenciar em células de memória de longa duração que retêm um fenótipo polifuncional por pelo menos dois anos<sup>130</sup>. Cinco a seis por cento dos aproximadamente 2000 clones de células T CD8+ que respondem à 17D<sup>135</sup> se diferenciam em várias populações de memória, incluindo as memórias central e efectora. Essas células diminuem

lentamente ao longo do tempo, mas podem permanecer detectáveis por mais de 25 anos<sup>136,137</sup>.

As células T CD4+ específicas para as cepas 17D produzem uma mistura de citocinas do tipo Th1 (como IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12) e Th2 (incluindo IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13)<sup>129,138-140</sup>. As células T do tipo Th1 caracteristicamente promovem as respostas de T CD8+, enquanto que as citocinas de Th2 promovem as respostas de células B e anticorpos<sup>120</sup>.

Estudos de encefalite por FA após desafio intracerebral direto em modelos animais nocautes de células T e B e avaliação em camundongos das respostas celular e humoral seguidas da vacinação mostraram que tanto anticorpos (produzidos pelas células B) quanto linfócitos T CD4+ possam ser mediadores críticos de proteção<sup>141,142</sup>.

A imunidade humoral é um componente da resposta do hospedeiro aos *Flavivirus* essencial para controlar a disseminação da infecção e impedir a replicação viral no sistema nervoso central por cepas encefálicas. A transferência passiva de anticorpos policlonais ou monoclonais contra proteínas protege camundongos de desafio letal em vários sistemas de *Flavivirus*<sup>143,144</sup>.

Os anticorpos protegem contra a infecção por *Flavivirus* por múltiplos mecanismos, incluindo: (I) neutralização direta da ligação ao receptor, (II) inibição da fusão viral, (III) remoção viral dependente do receptor Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R), (IV) lise mediada pelo Complemento de vírus ou células infectadas e (V) citotoxicidade celular dependente de anticorpo<sup>145</sup>.

A resposta humoral ao vírus da FA é caracterizada pela presença de anticorpos de imunoglobulina (Ig) M durante a primeira semana da doença. O pico de IgM é atingido durante a segunda semana após o início da doença e diminuem rapidamente em 30 a 60 dias. No entanto, esses anticorpos podem persistir por períodos prolongados após a vacinação 17D e, apesar de ainda não ter sido investigado mais profundamente, esse mesmo fenômeno pode também ocorrer após infecção com FA selvagem. A magnitude da resposta de IgM em casos de infecção primária por FA é significativamente maior do que em pacientes com exposição prévia a *Flavivirus*, em quem a proporção de IgM para IgG é baixa<sup>2</sup>.

Anticorpos com atividade biológica (neutralização e inibição da hemaglutinação) aparecem rapidamente, tipicamente pelo quinto dia da doença<sup>2,146,147</sup>. No entanto, as respostas de anticorpos inibidores da hemaglutinação

(HI, do inglês “hemagglutination-inhibiting”) e de neutralização (N) não estão vinculadas em todos os casos, refletindo determinantes antigênicos diferentes para HI e N no envelope viral<sup>148</sup>.

Os anticorpos HI atingem um pico entre 30 e 60 dias após a infecção e um declínio significativo no título ocorre durante os 6 meses seguintes. Os anticorpos neutralizantes persistem por muitos anos, senão por toda a vida após a infecção por FA natural, onde já foram detectados até 78 anos após a doença. Ademais, parecem fornecer proteção completa contra a doença quando na reexposição ao vírus, não havendo relato documentado de uma segunda infecção clínica por FA<sup>2,149,150</sup>.

Os anticorpos de fixação do Complemento (CF, do inglês “Complement-fixing”) aparecem durante a segunda semana após o início da doença, aumentam durante o período de convalescença e diminuem entre 4 e 12 meses após o início dos sintomas. Diferentemente das respostas de IgM e de anticorpos neutralizantes após a vacina 17D, os anticorpos CF são ausentes em indivíduos sem exposição prévia a *Flavivirus*<sup>2</sup>.

A proteína E dos vírus da FA e de outros *Flavivirus* contém determinantes antigênicos responsáveis pela neutralização e respostas de células T citotóxicas e, portanto, desempenha papel principal na imunidade protetora<sup>75</sup>. Estudos de imunização ativa de camundongos com vírus recombinante da vaccinia expressando a proteína E<sup>151</sup> e de imunização passiva de camundongos com anticorpos monoclonais anti-E<sup>152,153</sup> demonstraram o papel dos anticorpos neutralizantes como mediador da imunidade protetora contra a FA<sup>2</sup>.

Os epítomos neutralizantes do vírus da FA são conformacionais (compostos por sequências peptídicas descontínuas) ou contíguos<sup>154-156</sup>. O vírus amarelo contém múltiplos determinantes neutralizantes, alguns dos quais são conservados entre as diferentes cepas<sup>156-158</sup>. Três epítomos de neutralização específicos mapeados no nível genômico por sequenciamento são encontrados em E-71/72 no domínio II, E155 no domínio I e E305/325 no domínio III. Outros epítomos mostram atividade neutralizante de reação cruzada, e alguns deles são fortemente neutralizantes, como por exemplo, um epítomo no circuito de fusão da proteína E que bloqueia a internalização do vírus<sup>154</sup>. A resposta imune policlonal complexa é, portanto, capaz de proteger contra múltiplas cepas de vírus que podem diferir em um ou em vários epítomos, mas não todos<sup>2</sup>.

A neutralização é um fenômeno “multihit”, necessitando da ligação de múltiplos anticorpos para que haja a neutralização de um único virion. O número de moléculas de anticorpos necessárias para neutralizar o vírus depende de dois fatores biológicos: acessibilidade do epítopo na partícula viral (em geral, os epítopos na superfície externa do domínio III são neutralizadores fortes e os epítopos nos domínios I e II são menos potentes) e a afinidade do anticorpo<sup>144</sup>.

A força de ligação entre o anticorpo e o antígeno (afinidade) determinará a fração de epítopos na partícula viral ocupada pelo anticorpo em qualquer concentração dada (referida como ocupação de anticorpo) e é um determinante primário da potência de neutralização<sup>159</sup>.

Os epítopos virais podem ser diferencialmente acessíveis para a ligação de anticorpos devido a restrições estéricas impostas por proteínas E adjacentes na partícula viral. Assim, o número de sítios disponíveis para ligação pode diferir entre epítopos estruturalmente distintos no virion. A acessibilidade é um fator significativo que modula a potência de anticorpo e determina os requisitos de ocupação para a neutralização. Os anticorpos que se ligam aos determinantes altamente expostos podem exceder o limiar estequiométrico para a neutralização, ligando ao virion em uma ocupação relativamente baixa<sup>160</sup>. Em contrapartida, os epítopos que são mal-expostos podem exigir uma ocupação quase completa para atingir os requisitos de limiar para a neutralização<sup>160,161</sup>.

Os anticorpos têm o potencial de neutralizar a infecciosidade de *Flavivirus* interferindo em várias etapas da via de entrada do vírus, incluindo a adsorção, internalização e fusão<sup>159</sup>.

Durante a etapa de ligação, os anticorpos podem bloquear a infecção pelo *Flavivirus* inibindo as interações entre virion e superfície celular. Estudos mostraram que anticorpos monoclonais específicos para o domínio III bloqueiam a infecção nesta fase<sup>162</sup>. Várias evidências indiretas sugerem que este domínio desempenha um papel importante na adsorção viral a receptores celulares<sup>163</sup>.

Anticorpos monoclonais também têm potencial para neutralizar a infecciosidade em etapas posteriores à ligação, talvez inibindo as mudanças conformacionais na proteína E associadas à fusão de membranas, prevenindo a liberação do RNA viral no citoplasma<sup>144,154,164</sup>. Análises da reconstrução estrutural e crioelétrica sugerem que o encaixe do anticorpo no virion impõe restrições estéricas nos rearranjos mediados por pH baixo das proteínas E e que conduzem à fusão<sup>165,166</sup>.

Os anticorpos também podem inibir a infecção de *Flavivirus* por ativação de funções efetoras dependentes da porção Fc, incluindo a ativação do Complemento. Estudos usando modelos animais de infecção por *Flavivirus* destacam a importância do sistema Complemento intacto para imunidade humoral<sup>167,168</sup>. A opsonização viral com os componentes da via clássica C1q, C4b e C3b pode promover a formação do complexo de ataque à membrana (C5b-C9) que resulta na lise direta do virion<sup>144</sup>.

O Complemento pode também aumentar a potência de neutralização dos anticorpos diretamente pela modulação dos requisitos de ocupação para a neutralização: aumentando a avidéz do anticorpo ou os efeitos estéricos do anticorpo ligado, podendo resultar em bloqueio de adsorção ou fusão do vírus<sup>169</sup>.

O fenômeno de potencialização da infecção dependente de anticorpo (ou ADE, do inglês “antibody-dependent enhancement”) descreve o aumento considerável na infecção de células portadoras de FcγR ou receptores do Complemento na presença de concentrações subneutralizantes de anticorpos ou soros imunes. ADE foi demonstrado in vitro em monócitos/macrófagos para diversos *Flavivirus*, incluindo o vírus da FA<sup>144</sup>. Nesse contexto, acredita-se que anticorpos desempenhem um papel na doença exacerbada após a infecção pelo vírus da dengue<sup>170</sup>.

O fenômeno de ADE é tipicamente mediado por complexos vírus-anticorpo não neutralizante que se ligam às células via FcγR tipo I ou II ou receptores do Complemento e aumentam a internalização do vírus<sup>2,171-173</sup>. No entanto, observou-se ADE em células semelhantes a macrófagos na presença de anticorpos neutralizantes, sugerindo que as células portadoras de FcγR poderiam facilitar a infecção após a inoculação do vírus da FA em um hospedeiro imune, enquanto células portadoras de outros receptores de vírus estariam protegidas<sup>2,174</sup>.

As respostas de anticorpos seguidas de infecção amarela primária são específicas para o antígeno da FA. Com a maturação de afinidade, a especificidade diminui e as reações cruzadas com *Flavivirus* relacionados aparecem durante a segunda semana após o início da doença<sup>147</sup>. Pacientes com imunidade heteróloga prévia a *Flavivirus* desenvolvem respostas de anticorpos amplamente cruzadas<sup>2,175</sup>.

A especificidade da resposta imune difere com o teste utilizado: o teste de inibição da hemaglutinação é menos específico, o de fixação do complemento é intermediário e o teste de neutralização é o mais específico. O ensaio imunoenzimático de captura de anticorpos IgM (MAC-ELISA) é específico para os

casos de infecção primária, mas as reações cruzadas se desenvolvem ao longo do tempo e nos casos com experiência anterior a *Flavivirus*<sup>2,175</sup>.

As respostas imunes humorais às proteínas NS de FA não foram amplamente estudadas em infecções humanas, mas seu papel foi parcialmente explorado experimentalmente<sup>2</sup>. Anticorpos específicos para as proteínas NS não neutralizam diretamente a infecciosidade do vírus, mas podem proteger por outros mecanismos efetores<sup>144</sup>.

As respostas de anticorpos às infecções naturais analisadas por Western blot mostram que anticorpos anti-NS1 são tipo-específico e, portanto, têm valor no diagnóstico da infecção por *Flavivirus* de reação cruzada<sup>176</sup>. A proteína NS1 está presente no citoplasma e na superfície das células infectadas, sendo secretada destas e contendo determinantes que causam o aparecimento de anticorpos CF<sup>177</sup>.

A partir de um ensaio descrito para o diagnóstico da doença causada pelo vírus do oeste do Nilo,<sup>178</sup> anticorpos contra outra proteína não estrutural (NS5) mostraram ser induzidos pela vacina 17D, mas o papel de anti-NS5 na proteção, se houver, não está definido<sup>2</sup>.

As respostas de anticorpos à NS3 foram descritas em pacientes com infecções secundárias por dengue<sup>179</sup>.

### **1.1.5 A Vacina**

Durante o outono de 1925, Adrian Stokes liderou uma expedição para estudar a FA na África Ocidental. No decorrer dos estudos, eles isolaram uma cepa virulenta de um homem ganês chamado Asibi, com um quadro leve de FA. O vírus Asibi foi passado em macacos rhesus por transferência direta de sangue e posteriormente por mosquitos infectados. Com exceção de dois macacos, o vírus Asibi se mostrou letal, causando sintomas que eram semelhantes aos casos humanos de FA<sup>180,181</sup>. Os estudos realizados pela expedição de Stoke foram revolucionários em vários níveis, sendo os primeiros a estabelecer modelos animais experimentais de FA e mostrar que soro de seres humanos convalescentes poderia proteger animais infectados experimentalmente<sup>120</sup>.

O vírus Asibi foi transportado para o Instituto Rockefeller, onde Max Theiler e colegas descobriram que o vírus, embora refratário ao crescimento em animais de

laboratório a partir da maioria das rotas de injeção, se replicariam no cérebro de camundongos se inoculados por via intracraniana<sup>120,182</sup>, representando o primeiro registro de camundongos utilizados como modelo animal. A passagem em cérebros de camundongo reduziu a virulência viscerotrópica em macacos, mas aumentou as propriedades neurotrópicas, causando doença letal quando injetado no cérebro<sup>120,183</sup>.

As preocupações com o neurotropismo levaram o grupo de Theiler a passar o vírus mais de 200 vezes em meio de cultura com embriões de galinha, em que o tecido neurológico foi removido. Então, designou-se uma subcultura do vírus Asibi, a 17D. Embora esta permaneça virulenta quando injetada em cérebros de camundongo, o vírus perdeu sua neurovirulência em macacos, causando apenas uma "reação febril moderada" quando injetada por via intracerebral. Além disso, o vírus já não causou doença viscerotrópica em macacos quando inoculados subcutaneamente, apenas uma infecção muito leve<sup>120,184</sup>.

Juntamente com esses achados, Theiler publicou relatório mostrando que sete dias após a administração da subcultura 17D, macacos estavam completamente protegidos para o desafio com o vírus Asibi e o soro imune pôde ser detectado em um mês. Em torno de sete dias após o desafio, nenhum vírus circulante de Asibi foi detectado no sangue de macacos vacinados. Em humanos injetados com 17D, o soro imune anti-FA foi detectado tão cedo quanto dois dias após a imunização. Os oito sujeitos do teste apresentaram apenas uma ligeira febre, dor de cabeça leve e dor nas costas, insuficientes a incapacitar para suas atividades diárias normais. Em 1951, Max Theiler receberia o prêmio Nobel de fisiologia e medicina por ter desenvolvido uma vacina eficaz contra a FA<sup>120,185</sup>.

O desenvolvimento, em 1936, da vacina viva atenuada 17D para FA foi um marco na história das vacinas virais, representando o auge do sucesso de vacinas, ao lado daquelas para varíola e poliomielite. A subcultura 17D do vírus Asibi tornou-se a cepa semente para as vacinas atualmente disponíveis comercialmente para o vírus da FA: 17DD (passagem 195) – utilizada no Brasil, fabricada por Bio-Manguinhos/Fiocruz – e 17D-204 (passagem 204) – utilizada por outros 5 fabricantes estrangeiros<sup>120</sup>. Ambas são produzidas a partir de extratos de ovos de embriões de galinha infectados, utilizando tecnologia que mudou pouco desde 1945<sup>186,187</sup>. A metodologia de produção destas vacinas é bem definida, eficiente e segue um rigoroso controle de qualidade, além de serem baratas e administradas em dose única<sup>188–190</sup>.

Os genomas das cepas vacinais derivadas da 17D foram sequenciados e observou-se que a Asibi difere delas em 48 nucleotídeos, codificando a substituição de 20 aminoácidos<sup>186</sup>.

Ao longo dos anos, os sequenciamentos genômicos de lotes vacinais e suas sementes de trabalho/máster mostraram informações importantes sobre a homogeneidade relativa e estabilidade desta vacina viva atenuada. Comparações de sequências obtidas de vacinas produzidas por diferentes fabricantes indicaram que as cepas 17D e 17DD mantêm uma homologia geral de mais de 99%. Diferenças na codificação de 29 aminoácidos espalhados por toda a ORF do genoma viral foram descritas entre diferentes preparações de 17D e 17DD, dos quais aproximadamente um terço ocorre na região de codificação da proteína E. As cepas 17DD comparadas à 17D diferiram em 56 nucleotídeos, dos quais 18 codificam alterações de aminoácidos, mas somente 12 alterações de nucleotídeos foram compartilhadas por todas as cepas 17DD avaliadas<sup>191</sup>.

Da mesma maneira, a análise molecular de múltiplos lotes de vacina preparados por um único fabricante ao longo de um período de 12 anos mostrou a conservação de sequências consenso, apontando para a robustez do processo de fabricação e a estabilidade inerente do vírus 17D. Sequências genômicas obtidas de soros coletados 5 dias após a vacinação com a 17D-204 de cinco pacientes revelaram somente uma ou duas alterações nucleotídicas em nível de consenso, mostrando que a administração da vacina viva atenuada ao hospedeiro humano não resulta em seleção rápida de variantes minoritárias<sup>192,193</sup>.

A estreita relação antigênica entre as cepas do vírus amarelo sugere que qualquer cepa usada como base para um antígeno vacinal pode estimular uma proteção significativa contra todos os genótipos do vírus da FA. Portanto, a diversidade de sequências do vírus parece ter pouca consequência para o uso das vacinas atuais baseadas na 17D e para o desenvolvimento de novas vacinas. De maior interesse é a estabilidade do genótipo atenuado das vacinas disponíveis<sup>187</sup>.

O potencial de alterações na virulência e/ou nas propriedades imunogênicas das vacinas 17D impôs requisitos rigorosos relacionados à passagem e preparação de sementes máster e de trabalho e a caracterização de lotes de vírus vacinais. Recentemente, autoridades regulatórias e de saúde pública e fabricantes de vacinas reexaminaram esses requisitos e investigaram a utilidade potencial de sequenciamento genômico de novos estoques de sementes máster ou de trabalho

como ferramenta para avaliar as estabilidades genética e fenotípica de vírus vacinais e garantir a consistência da produção<sup>187</sup>.

Não existe nenhum tratamento específico para a FA além de cuidados de suporte. A vacinação é a maneira mais eficaz de prevenir e controlar a doença. Mais de 500 milhões de pessoas receberam as vacinas baseadas em 17D, desde a sua disponibilidade em 1937<sup>120</sup>.

Múltiplas estratégias de imunização já foram aplicadas em países endêmicos, incluindo a introdução da vacina no cronograma de vacinação infantil, campanhas em massa preventivas e reativas e vacinação de viajantes para zonas de risco da FA. Combinado com os programas de controle vetorial, a vacinação levou a uma redução notável na carga da doença em tempos e locais específicos<sup>194,195</sup>. A OMS recomenda cobertura vacinal da população de 80% ou mais para prevenir e controlar surtos em áreas urbanas. No entanto, em muitas áreas de risco da FA, este percentual permanece muito baixo<sup>24,196</sup>.

O fornecimento global da vacina de FA imediatamente disponível de todos os seis fabricantes mundiais é de aproximadamente 5 milhões de doses. A produção anual é de cerca de 80 milhões de doses. No geral, o abastecimento é insuficiente para a demanda quase todos os anos. A possibilidade de todos os fabricantes aumentarem sua capacidade de produção é limitada. A insuficiência é acentuada em situações de emergência, como nos surtos recentes em regiões da África e América do Sul<sup>197</sup>.

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz), vinculado ao MS, é o maior produtor mundial da vacina para a FA. A sua produção mensal é de 4 milhões de doses, em situações de rotina. Mas, atualmente, 6 milhões de doses por mês estão sendo produzidas em função do aumento da demanda. O Instituto, no entanto, tem capacidade para produzir 9 milhões de doses por mês, ou 108 milhões de doses anuais<sup>198</sup>.

Considerando o cenário da doença em 2016, Shearer e colaboradores<sup>196</sup> estimaram que há entre 393,7 e 472,9 milhões de indivíduos não imunizados em regiões no mundo classificadas como em risco da doença, para atingir a recomendação de 80% de cobertura vacinal da população. Cerca de 87% desses indivíduos vivem na África e os demais na América Latina. Avaliando essas estimativas e a classificação da OMS de países em risco para FA – em que 27 países africanos foram classificados como alto risco e outros 8 como risco moderado; e 13

países da América latina e Caribe como de alto risco ou com áreas de alto risco<sup>199</sup> – com exceção de Bolívia, Peru e Senegal, todos os países continham áreas em risco com cobertura vacinal inferior a 80%<sup>196</sup>.

Em face das demandas crescentes, os 4 principais fabricantes que fornecem o estoque global da vacina vem trabalhando para atender às campanhas de vacinação emergenciais e reabastecer o estoque programado para 6 milhões de doses ao ano<sup>200</sup>. A OMS objetiva eliminar as epidemias de FA em todo o mundo até 2026<sup>199</sup>.

A vacina para FA é recomendada para indivíduos com idade maior ou igual a 9 meses que vivem ou viajam para áreas endêmicas na África e América do Sul. Devido ao risco de propagação do vírus, as políticas relativas ao uso da vacina de FA estão incluídas no Regulamento Sanitário Internacional (RSI) e, portanto, países podem exigir recibo da vacina para a entrada em seus territórios. Até então, a OMS reconhecia que uma única dose da vacina protegia contra a infecção pelo vírus amarelo a partir do 10º dia após a imunização e continuando por 10 anos, quando deveria ser administrada uma dose de reforço<sup>201</sup>.

Mas, em 17 de maio de 2013, o Grupo Consultivo Estratégico de Especialistas (SAGE, do inglês “Strategic Advisory Group of Experts”) da OMS anunciou uma mudança de paradigma em relação à política de vacinação da FA, afirmando que não havia necessidade de revacinação dos indivíduos 10 anos após a vacinação inicial; que uma única dose da vacina de FA é suficiente para conferir imunidade sustentada e proteção ao longo da vida contra a doença<sup>202,203</sup>. Considerando a evidente sobrecarga no abastecimento das vacinas 17D, a redução da necessidade de revacinação viria ao encontro da atual e crescente demanda, aumentando a quantidade de vacina disponível<sup>204</sup>.

Essa decisão foi baseada em revisão sistemática de estudos publicados sobre a duração da imunidade após uma única dose da vacina de FA e em dados sugerindo que falhas vacinais são extremamente raras e não aumentam a frequência com o tempo a partir da vacinação<sup>205</sup>. O grupo observou que estudos futuros e dados de vigilância deveriam ser usados para identificar grupos de risco específicos, como pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou crianças, que poderiam se beneficiar da dose reforço. Em maio de 2014, a Assembleia Mundial da Saúde adotou a recomendação de remover a dose reforço de 10 anos do RSI até junho de 2016<sup>206</sup>.

Em contrapartida, estudos realizados recentemente no Brasil apontaram dados divergentes daqueles que suportaram a decisão da OMS de mudar o esquema de vacinação para a FA. Um grupo colaborativo para estudos da vacina de FA conduziu um estudo clínico para estimar a taxa de soropositividade e os títulos de anticorpos neutralizantes em adultos com diferentes tempos de vacinação com a 17DD, visando fornecer elementos para revisar a necessidade e o momento da revacinação. Apesar de preliminares, os dados obtidos indicaram a necessidade da dose de reforço para garantir proteção mais longa para todos os vacinados<sup>207</sup>.

Corroborando esses primeiros dados sorológicos, outra análise voltada para as células de memória do sistema imune mostrou que a dose reforço parece ser necessária para garantir proteção mais longa. Esses estudos embasaram as diretrizes nacionais de política de vacinação no Brasil que permaneceram recomendando dose reforço 10 anos após a vacinação primária<sup>208</sup>.

Em janeiro do presente ano, o MS anunciou a implementação de um esquema de vacinação especial, com uso de doses fracionadas para três estados brasileiros: São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia<sup>209</sup>. Em março, o MS ampliou a recomendação da vacina para todo o território nacional até dezembro deste ano. A medida é uma tentativa de antecipar a proteção da população para a doença em caso de uma futura circulação do vírus<sup>210</sup>.

O fracionamento de doses é recomendação da OMS em casos de extensão da FA silvestre de forma intensa, aumentando o risco da expansão da doença em cidades com elevado contingente populacional, o que exige realizar a intensificação vacinal em curto prazo de tempo<sup>211</sup>. Estudos têm demonstrado que a dose fracionada tem a mesma imunogenicidade da dose padrão<sup>212-214</sup>. Esta versão da vacina 17DD é absolutamente segura e a proteção comprovada era, até 2017, de oito anos. Outros estudos deverão ser realizados para determinar a necessidade de uma nova dose a partir da dose fracionada<sup>209</sup>.

As vacinas 17D-204 e 17DD representam as vacinas desenvolvidas até à data com o melhor desempenho, sendo consideradas seguras e altamente imunogênicas, induzindo a formação de anticorpos protetores de longa duração<sup>215,216</sup>. Não existem diferenças significativas na segurança ou imunogenicidade entre as vacinas 17D e eventos adversos graves associados a elas são raros<sup>1</sup>. A eficácia dessas vacinas é evidenciada pela redução significativa na incidência da FA seguida de vacinação em massa<sup>207</sup>.

Apesar de eventos adversos graves serem raros, a segurança da vacina 17D começou a ser questionada após a publicação, em 2001, de 7 casos (6 fatais)<sup>217-219</sup> de insuficiência aguda de vários órgãos, semelhante à FA selvagem, causada por infecções com o vírus 17D (doença viscerotrópica associada à vacina da FA ou YEL-AVD, do inglês “yellow fever vaccine associated viscerotropic disease”). Durante os 10 anos seguintes, 65 casos foram registrados, com uma taxa de letalidade elevada de 63%<sup>2</sup>.

Mas, felizmente, YEL-AVD é raro. A taxa de notificação de YEL-AVD nos EUA foi estimada em 0,4 por 100.000 doses, mas é maior com o avanço da idade, atingindo 1,0-2,3 por 100.000 em pessoas com mais de 60 anos<sup>220,221</sup>. Taxas similares foram estimadas durante campanhas de vacinação em massa em regiões do Brasil de populações sem vacinação prévia<sup>222</sup>.

A letalidade desses eventos adversos é maior do que a doença causada pelo tipo selvagem do vírus, refletindo o fato de que muitos pacientes afetados tinham condições subjacentes associadas à desregulação imune. Acredita-se que esses eventos estejam associados à susceptibilidade do hospedeiro ao invés de mutações da cepa 17D, causando aumento da virulência do vírus. Suspeita-se de que a base imunológica da susceptibilidade a eventos adversos graves (viscerotrópicos) após a vacina 17D seja insuficiência ou disfunção na resposta imune inata do indivíduo vacinado<sup>2,223</sup>.

A doença neurotrópica associada à vacina da FA (YEL-AND, do inglês “yellow fever vaccine associated neurotropic disease”) normalmente se apresenta como meningite ou encefalite atribuída a neuroinvasão e lesão viral direta. Os demais casos apresentam evidências clínicas ou radiológicas para síndromes inflamatórias desmielinizantes (Guillain Barré ou encefalomielite disseminada aguda), sugerindo uma base autoimune, possivelmente desencadeada por infecção neural anterior. Relatos de casos individuais descrevem uma grande variedade de outras síndromes neurológicas e oculares temporariamente associadas à vacina 17D<sup>1</sup>.

Os eventos adversos neurológicos são raros, provavelmente um pouco mais frequentes do que a doença viscerotrópica, com taxa global de notificação de 0,4-0,8 por 100.000 doses nos EUA, por exemplo. Assim como observado para YEL-AVD, as taxas de notificação de YEL-AND são maiores em pessoas com mais de 60 anos (1,4-1,8 por 100.000)<sup>220,221</sup>. A recuperação é a regra, as mortes são raras (<1,0%) e as

sequelas neuropsiquiátricas são incomuns, mas estudos sistemáticos de acompanhamento a longo prazo não foram realizados<sup>1</sup>.

As vacinas anti-FA induzem resposta imune forte, rápida e duradoura. A resposta adaptativa pós-imunização é caracterizada pela indução robusta de anticorpos e células T, como discutido na seção anterior (1.1.4). Anticorpos neutralizantes são o correlato primário de proteção em vacinados. Estudos com diferentes *Flavivirus* indicaram que a proteção de animais à infecção viral está correlacionada aos anticorpos neutralizantes e, portanto, a determinação destes como avaliação de imunogenicidade vacinal indica a eficácia da vacina<sup>224–227</sup>. No entanto, estudos mais recentes têm demonstrado que não somente as respostas de anticorpos neutralizantes, mas também as de células T são importantes para a proteção contra o vírus da FA<sup>142,228</sup>.

Anticorpos neutralizantes são direcionados para um número pequeno de epítomos altamente conservados, presentes na glicoproteína E do envelope viral<sup>1</sup>. Além da especificidade, os anticorpos neutralizantes aparecem rapidamente. Dez dias após a vacinação é possível observá-los em quase 90% dos vacinados<sup>2</sup> e dentro de 30 dias para 99% dos vacinados (adultos e crianças acima de dois anos de idade)<sup>196</sup>. Ademais, há fortes evidências de que esses anticorpos medeiam uma proteção longa à doença e, portanto, acredita-se que a sua medição forneça o melhor correlato de imunidade aos *Flavivirus*<sup>145</sup>.

No entanto, não é possível afirmar seguramente a correlação entre os títulos de anticorpos neutralizantes e a proteção à infecção viral, mas se deve considerar que a presença desses anticorpos é um importante indicador de memória imunológica e pode determinar associação direta entre sorologia positiva e proteção imune<sup>207</sup>.

Assim, considerando o papel protetor dos anticorpos neutralizantes para FA, a avaliação da resposta desses anticorpos é fundamental nos estudos de eficácia das vacinas 17D<sup>1</sup>.

### **1.1.6 Testes Sorológicos para a Quantificação de Anticorpos**

O diagnóstico laboratorial confirmatório para FA depende da detecção de anticorpos específicos, detecção do antígeno ou ácido nucleico no sangue ou nos

tecidos por isolamento viral, RT-PCR, imuno-histoquímica ou a detecção de patologia no fígado (após a morte do indivíduo) associada com sinais clínicos prévios de FA<sup>229</sup>.

Um caso isolado de FA é um desafio diagnóstico mais difícil do que um conjunto de casos semelhantes. O quadro clínico leve de FA, caracterizado por febre, dor de cabeça, mal estar e mialgias, pode se assemelhar a muitas outras infecções arbovirais e gripe<sup>2</sup>. Os casos graves da doença também devem ser submetidos ao diagnóstico diferencial para distinguir de outras síndromes ictero-hemorrágicas, como a malária, hepatites virais, leptospirose, dengue hemorrágico e septicemias<sup>230</sup>.

*Flavivirus* contêm epítomos de reação cruzada que dificultam o diagnóstico por todos os métodos sorológicos de determinação de anticorpos para FA e outras espécies do gênero, principalmente em regiões onde vários *Flavivirus* cocirculam<sup>231</sup>. Pacientes que tiveram infecção heteróloga prévia e que desenvolvem FA podem ter respostas mais elevadas ao vírus original; e aqueles que tiveram infecção ou vacinação prévia para FA e que posteriormente são infectados por outro *Flavivirus* podem ter respostas imunes mais altas à FA<sup>2,232</sup>.

As determinações de IgM e IgG são os métodos de escolha para o diagnóstico sorológico de rotina das infecções por *Flavivirus*<sup>231</sup>. As reações cruzadas são mais frequentemente observadas na detecção de anticorpos IgG e, em menor grau, na detecção de anticorpos IgM<sup>231,233</sup>. Embora os métodos mais antigos (inibição da hemaglutinação – HI – e fixação do complemento – CF) sejam úteis, eles têm sido substituídos por métodos mais simples e rápidos, como MAC-ELISA e ensaios de imunofluorescência indireta (IFA) mais recentes<sup>234,235</sup>.

O ensaio de HI é tradicionalmente utilizado para o diagnóstico e classificação de *Flavivirus*<sup>236,237</sup>. Anticorpos totais contra os vírus, incluindo IgM e IgG, são detectados por esse teste, cuja base consiste em inibir a aglutinação de eritrócitos ao vírus pelos anticorpos. Uma das vantagens do HI é que não é espécie-específico e pode ser usado para testar soro de qualquer animal, tornando-o útil para a vigilância de doenças. Outra vantagem é que não requer nenhum anticorpo, equipamentos caros ou instrumentos especializados. A desvantagem está nos resultados apresentarem forte reação cruzada entre infecções por *Flavivirus*, especialmente entre aqueles pertencentes ao mesmo grupo do sorocomplexo, dificultando a sua interpretação. Portanto, HI é caracterizado como um teste pouco específico. Além disso, o controle de qualidade dos reagentes, a execução do teste e a padronização são difíceis para esse tipo de ensaio<sup>237</sup>.

O teste CF não é utilizado na rotina de diagnóstico por ser de difícil execução, requerendo operadores altamente qualificados e treinados para se obter bons resultados. A reação de CF, assim como o teste HI, detecta anticorpos totais e se baseia no princípio de que o Complemento é um agente lítico do sistema imune, com capacidade de se fixar a imunocomplexos. Os anticorpos CF geralmente aparecem mais tarde do que os anticorpos HI, e persistem por períodos curtos, sendo de valor limitado para os estudos soroepidemiológicos. O teste CF é menos sensível, porém mais específico que o HI. Os anticorpos detectados são bastante específicos nas infecções primárias, contribuindo para a determinação da cepa viral infectante<sup>238,239</sup>.

As determinações no soro de anticorpos IgG e IgM baseados em ensaios imunoenzimáticos são amplamente utilizados no diagnóstico de rotina de infecções por *Flavivirus*<sup>231</sup>. Tanto o ELISA para a detecção de anticorpos IgG quanto para a detecção de anticorpos IgM demonstraram boa correlação com os resultados obtidos pelo teste de neutralização<sup>240,241</sup>.

Atualmente, o teste diagnóstico mais difundido é a detecção de anticorpos IgM anti-FA pelo método de MAC-ELISA. Realizado em algumas horas, o MAC-ELISA fornece um diagnóstico presuntivo de FA, sendo o teste de eleição para triagem de casos, por ser sensível e dispensar coleta de duas amostras<sup>1</sup>. A especificidade desse teste varia de acordo com a fonte dos antígenos. Cérebros de camundongos infectados com vírus, antígenos derivados de culturas de tecidos e proteínas virais recombinantes representam as possíveis fontes de antígenos utilizadas para esse protocolo. O teste realizado a partir de antígenos recombinantes purificados é mais específico, mas menos sensível do que aqueles que utilizam antígenos de outras fontes<sup>242</sup>.

A limitação do MAC-ELISA é a bem conhecida reação cruzada entre *Flavivirus*, incluindo o vírus causador da dengue<sup>243</sup>. Em áreas sem *Flavivirus*, esse teste quando positivo é indicativo de FA. Outro problema é que a produção de anticorpos IgM em infecções secundárias por *Flavivirus* pode ser inferior. Na verdade, durante as infecções secundárias, a IgM só é produzida nos primeiros dois a três dias e em títulos baixos, às vezes no limiar de detecção do MAC-ELISA<sup>1</sup>. Mas deve considerar-se também que, após as infecções por FA, a IgM pode persistir por longos períodos, até um ano ou mais<sup>244</sup>, não sendo um marcador confiável de infecção recente por FA<sup>1</sup>. Além disso, alguns vírus, tais como o vírus da encefalite japonesa e o vírus do

oeste do Nilo, estabelecem infecções persistentes, complicando o diagnóstico devido à continuidade dos vírus e dos anticorpos IgM<sup>245</sup>.

A técnica da IFA utiliza anticorpos conjugados a corantes fluorescentes para revelar, no microscópio de fluorescência, a formação de imunocomplexos vírus-anticorpo. IFA pode detectar tanto anticorpos IgG quanto IgM (dependendo do conjugado utilizado)<sup>239</sup>. Na infecção primária, anticorpos IgG são regularmente encontrados e a especificidade de IFA é comparável à obtida nos testes de CF e neutralização. Anticorpos IgM são altamente específicos, mas nem sempre são detectados por esta técnica devido à interferência de anticorpos IgG. Niedrig e colaboradores (2008) demonstraram que um teste de IFA, em casos sem imunidade preexistente à FA ou para outros *Flavivirus*, apresenta bom desempenho para a detecção de anticorpos IgM e IgG após a vacinação para FA<sup>235</sup>.

Embora muitos testes diagnósticos úteis estejam sendo desenvolvidos para a investigação sorológica, o teste de neutralização por redução de placas de lise – PRNT (do inglês “Plaque Reduction Neutralization Test”)<sup>246,247</sup> é a referência para a diferenciação sorológica de infecções por *Flavivirus* e para a análise da resposta imune protetora após a vacinação, com desempenho superior (principalmente, especificidade) aos demais testes sorológicos<sup>187,237,248</sup>. Isto se deve, especialmente, à capacidade desse método detectar os anticorpos neutralizantes, os quais aparecem precocemente, permanecem por muitos anos e são protetores, reduzindo ou eliminando a infecciosidade do vírus<sup>207,227,235</sup>.

Os testes de neutralização – resultantes de uma longa evolução, onde foram originalmente estabelecidos em metodologias “in vivo” e “in vitro” em camundongos<sup>249,250</sup> e posteriormente adaptados para cultura de células<sup>246,247</sup> – são fundamentados no princípio de que vírus, quando reagem com o anticorpo específico, são neutralizados e, portanto, perdem a capacidade de infectar células permissivas<sup>239</sup>. O PRNT determina o parâmetro biológico de neutralização viral “in vitro”, em que a partir de uma quantidade conhecida do vírus, determina-se a capacidade de diluições do soro impedir a formação de placas de lise em células suscetíveis<sup>227</sup>. Mas apesar da comprovada eficiência na determinação de anticorpos, não se conhece os títulos medidos pelo PRNT que sejam considerados correlatos de proteção para FA<sup>207,235</sup>.

Vários métodos já foram descritos para determinar anticorpos neutralizantes, os quais podem variar com relação à sensibilidade. Testes em camundongos realizados a partir da década de 1950 apresentavam variabilidade considerável. Os

testes de neutralização intraperitoneal em camundongos recém-nascidos ou com 18-21 dias de idade mostraram-se mais sensíveis para a detecção de anticorpos do que o teste intracerebral, devido à letalidade maior e mais rápida do vírus para camundongos desafiados por esta última via<sup>251,252</sup>.

Testes de neutralização em culturas celulares substituíram os testes em camundongos. Além de evitarem o uso de animais, são consideravelmente mais convenientes e menos dispendiosos, fornecendo resultados mais confiáveis e quantitativos e em período de tempo mais curto<sup>251-253</sup>.

Um estudo comparativo mostrou que o teste de neutralização intraperitoneal realizado em camundongos recém-nascidos foi um pouco mais sensível do que um teste de redução de placas de lise em células MA-104 em que diferentes diluições do vírus foram utilizadas para uma quantidade constante de soro, o denominado teste LNI (do inglês “Log Neutralization Index”)<sup>251</sup>. No entanto, testes em cultura de células, a partir de quantidade única (PRNT) ou variante do vírus (LNI), mostraram-se mais sensíveis do que os testes intracerebrais realizados em camundongos adultos ou recém-nascidos<sup>254</sup>.

O LNI, uma metodologia padronizada, reprodutível, validada e utilizada por grupos importantes na avaliação das vacinas de FA<sup>251,255-258</sup>, serve como correlato de proteção. O ponto de corte para soropositividade ( $LNI \geq 0,7$ ) foi estabelecido por estudos em macacos em que os animais foram desafiados com uma cepa selvagem letal<sup>259</sup>. No entanto, esta metodologia requer uma quantidade de soro considerável, o que dificulta o processamento de amostras com volume limitado<sup>252</sup>.

O PRNT, realizado a partir de quantidade constante do vírus e diluições seriadas de soro, utiliza quantidade ínfima de amostra biológica, sendo profusamente aceito e utilizado em estudos de avaliação da eficácia vacinal<sup>205,260,261</sup>. Em contrapartida, títulos de anticorpos determinados por PRNT são mais variáveis e não há um ponto de corte estabelecido correlacionado à proteção<sup>252</sup>. Geralmente, títulos  $\geq 1:10$  (primeira diluição do soro) são relacionados à proteção para o vírus da FA<sup>206</sup>.

Mas a comparação de estudos de avaliação da resposta vacinal a partir de dados obtidos por LNI e PRNT apresentaram resultados similares<sup>215,255,262</sup>, com uma boa correlação<sup>255</sup> e diferença não significativa nas análises de soroconversão determinadas por essas metodologias<sup>263</sup>.

O PRNT é um teste sabidamente falho na sua reprodutibilidade, trabalhoso, requer equipamentos e insumos específicos e leva vários dias para sua finalização,

não sendo facilmente passível de produção elevada, o que torna difícil a sua utilização em grande escala<sup>264</sup>. A metodologia padrão (ou clássica) do PRNT permanece sendo considerada referência e, portanto, novas abordagens para a quantificação de anticorpos neutralizantes devem ser validadas<sup>227,265</sup>.

No desenvolvimento de um novo teste diagnóstico se faz necessário demonstrar a sua utilidade, e para isso é importante focar em questões como confiabilidade e acurácia, além da aplicação prática e os efeitos dos resultados gerados nas decisões clínicas. Se o teste não fornece resultados consistentes quando realizado por operadores diferentes ou em pessoas diferentes, dificilmente será útil<sup>266</sup>.

No caso dos testes de neutralização, em que a metodologia varia bastante entre laboratórios – especialmente quanto à escolha do substrato celular, condições de incubação, forma de diluição dos soros, o tamanho dos poços e a definição do ponto (a porcentagem) de redução viral – é essencial que as metodologias utilizadas na avaliação da resposta imune vacinal estejam totalmente validadas, para que seja possível comparar os resultados gerados pelos diferentes laboratórios na avaliação de uma determinada vacina<sup>267</sup>.

O PRNT padrão pode ser entendido como a metodologia em que, após as etapas de neutralização e adsorção às células dos vírus não neutralizados, utiliza-se um meio semissólido para conter a proliferação viral (como, por exemplo, a carboximetilcelulose). O efeito citopático (placas de lise) é visualizado a partir de coloração da monocamada celular após alguns dias de incubação (geralmente de 6 a 7 dias). O uso das placas de 6 poços facilita a visualização e diminui as chances de sobreposição das placas de lise, permitindo titulações mais precisas<sup>227</sup>.

Atualmente tem se buscado padronizar uma nova geração de testes de neutralização a partir de modificações na metodologia clássica do PRNT. Encurtar o período de incubação requerido para a visualização das placas de lise, melhorar a visibilidade dessas placas de lise, automatizar ou eliminar a etapa de quantificação das placas de lise são exemplos de principais desafios dos novos testes que objetivam a otimização, o aumento da capacidade de processamento de amostras e melhoria da determinação dos títulos de anticorpos neutralizantes. Porém, qualquer nova abordagem para quantificar anticorpos neutralizantes terá de ser validada frente ao PRNT padrão, de modo que a relação e a equivalência entre as duas metodologias estejam totalmente compreendidos<sup>227,268</sup>.

A mais simples modificação no PRNT padrão é a redução do tamanho do poço para a formação das placas de lise<sup>227</sup>. A utilização de placas com poços de diâmetro menor (24 ou 96 poços) é comumente utilizada em ensaios clínicos e pré-clínicos de avaliação da resposta imune vacinal, em que grande quantidade de soros precisa ser processada<sup>212,269</sup>.

Outra abordagem metodológica recentemente explorada é a imunomarcação das células infectadas com vírus. Essa técnica é baseada na aplicação de um anticorpo antiviral conjugado ou não a uma enzima (geralmente peroxidase ou fosfatase alcalina) nas culturas de células infectadas por vírus. A ligação específica desse anticorpo ao seu alvo é detectada a partir de uma coloração imunohistoquímica adequada para a enzima utilizada. Essa abordagem permite a visualização dos vírus não neutralizados em um estágio mais recente de pós-infecção. Conseqüentemente, o tempo de incubação para visualização dos vírus é reduzido. Assim, além de um teste mais rápido, utiliza-se uma marcação mais específica do que a coloração clássica da monocamada celular com corantes não específicos, como o cristal violeta e o vermelho neutro<sup>227</sup>.

Novos testes utilizando a imunomarcação vêm sendo desenvolvidos e validados por grupos interessados na avaliação da resposta imune vacinal, explorando formas diferentes de determinação dos títulos de anticorpos neutralizantes: a partir da leitura da densidade óptica obtida<sup>264</sup> ou pela visualização direta das unidades formadoras de placas de lise (PFU, do inglês "plaque-forming units") por meio da imunomarcação<sup>268</sup>.

### **1.1.7 Avaliação do Desempenho de Teste Diagnóstico**

No desenvolvimento de um novo teste diagnóstico se faz necessário demonstrar a sua utilidade, e para isso é importante focar em questões como a confiabilidade do teste e a sua acurácia, além da aplicação prática e efeitos nas decisões clínicas e resultados desse teste. Respostas favoráveis a cada um desses pontos são necessárias, porém insuficientes para indicar a realização de determinado teste. Por exemplo, se o teste não fornece resultados consistentes quando realizado por operadores diferentes ou em pessoas diferentes, dificilmente será útil<sup>266</sup>.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão nacional que normatiza e regulamenta a validação de processos como testes biológicos, determina que a validação é a "confirmação por ensaio e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos." Assim, a validação de um método analítico é importante para demonstrar que os resultados obtidos são confiáveis e que o teste é apropriado para a finalidade a que se destina<sup>270</sup>.

A acurácia de um teste diagnóstico se refere à capacidade deste em discriminar entre aqueles que têm e os que não têm a condição de interesse, isto é, a frequência com que o teste acerta o resultado tanto para indivíduos com a doença quanto para aqueles sem a doença. A aferição da acurácia, dependente de um teste referência ("padrão ouro"), serve-nos de instrumento na constatação do grau de importância do teste em estudo e é. Antes, no entanto, de estabelecermos a acurácia do teste, há que se estar certo quanto à sua precisão, ou seja, a capacidade do teste produzir resultados consistentes (similares) quando repetido por diferentes observadores e instrumentos, em tempos e lugares diferentes<sup>266</sup>.

Uma questão importante para a pesquisa e a medicina clínica é o grau no qual observações diferentes de um mesmo fenômeno diferem. Se a precisão de um teste é evidenciada, os dados no estudo podem ser considerados fidedignos (confiáveis). No entanto, confiança não é prova de validade, pois dois observadores podem chegar aos mesmos resultados, mas estes estarem errados. E não é incomum a concordância imperfeita entre observadores, como também não é difícil observar o mesmo operador discordando dos seus próprios resultados realizados em ocasiões diferentes<sup>271</sup>.

A análise de concordância se refere à capacidade de aferir resultados (com a mesma unidade de medida) do mesmo sujeito/fenômeno, quer por instrumentos diferentes, pelo mesmo instrumento em tempos diferentes, por avaliadores diferentes, ou por alguma combinação dessas situações<sup>272,273</sup>. Para a análise de concordância, a correlação deve ser considerada mas também a coincidência entre os valores<sup>274,275</sup>.

O Coeficiente de Correlação Intraclasse (CCI) – considerado a melhor medida para avaliar a concordância de resultados de diferentes operadores<sup>276</sup> – é uma estimativa da fração da variabilidade total de medidas devido a variações entre os indivíduos. Podendo variar entre 0 e 1, a interpretação da magnitude desse estimador de concordância é convencionalizada como: 0 (ausência); 0-0,19 (pobre); 0,20-0,39

(fraca); 0,30-0,59 (moderada); 0,60-0,79 (substancial);  $\geq 0,80$  (quase completa)<sup>277-279</sup>. Quanto maior o CCI, menor a contribuição dos erros no processo de medida na variação total<sup>276</sup>.

A concordância de variáveis de natureza quantitativa pode ser representada graficamente pelo diagrama de Bland-Altman, que projeta no eixo X a diferença absoluta das medidas de cada ponto, e no eixo Y sua média<sup>272</sup>. Além de exibir toda a distribuição, ele permite avaliar tendências de piora da concordância de acordo com a dimensão das medidas<sup>280</sup>.

O instrumento de medida da correlação linear é dado pelo Coeficiente de Correlação de Pearson (representado por "r"); medida do grau de relação linear entre duas variáveis quantitativas. Este coeficiente varia entre os valores -1 e 1. O valor 0 significa que não há relação linear, o valor 1 indica uma relação linear perfeita. O valor -1 também indica relação linear perfeita mas inversa, ou seja, quando uma das variáveis aumenta a outra diminui. Quanto mais próximo estiver de 1 ou -1, mais forte é a associação linear entre as duas variáveis<sup>280</sup>.

A correlação linear representada graficamente (gráfico de dispersão) indica concordância entre duas séries de medidas quando a reta que descreve os pontos tem inclinação próxima de 45° e passa pela interseção dos eixos de X e Y<sup>281</sup>.

## 1.2 Justificativa

Bio-Manguinhos (Fiocruz), além de fabricar a vacina 17DD, desempenha papel fundamental nos estudos de avaliação das vacinas atenuadas 17D<sup>139,189,207,208,212,213,223,282-285</sup>. Paralelamente, o Instituto vem trabalhando no desenvolvimento de uma vacina inativada e outra de subunidade para FA<sup>260,261</sup>. A avaliação da imunogenicidade destas, assim como a das vacinas atenuadas, é baseada na determinação dos títulos de anticorpos neutralizantes, os quais são quantificados pelo micro PRNT. Este teste (aplicado em placas de 96 poços) é uma variação mais operacional da metodologia clássica do PRNT (aplicado em placas de 6 poços), reconhecido pela ANVISA para a avaliação da eficácia vacinal.

O Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV, da Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico de Bio-Manguinhos), possui longa experiência na

realização do micro PRNT. A ampla utilização desta técnica em estudos clínicos e pré-clínicos realizados na Fiocruz indicava a necessidade de uma avaliação estruturada do seu desempenho, pois já se observava limitações na reprodutibilidade do teste<sup>215</sup>. A ausência na literatura de uma análise completa do desempenho, utilizando as medidas ideais para determinação de confiabilidade e acurácia, reforçou a necessidade de se estudar o micro PRNT.

Em 2009, nosso grupo iniciou um estudo que teve por finalidade determinar a confiabilidade (repetibilidade e reprodutibilidade) e a acurácia (sensibilidade e especificidade) do micro PRNT para FA, tomando como referência a metodologia clássica do PRNT. Apesar de ter apresentado desempenho satisfatório, o estudo evidenciou a já conhecida variação do micro PRNT e a necessidade de mais estudos para aperfeiçoar a sua confiabilidade<sup>286</sup>.

Embora os resultados determinados pelo PRNT sejam amplamente considerados como referência, é possível que outras metodologias para a quantificação de anticorpos neutralizantes gerem resultados (títulos) que melhor se correlacionam com a proteção.

Além disso, de uma perspectiva prática e diante do cenário atual de alta cocirculação de diferentes *Flavivirus*, a busca por um teste preciso, acurado, mais rápido, menos laborioso e automatizado para a quantificação dos anticorpos neutralizantes vem ao encontro das necessidades de aumento da capacidade (para testar um grande número de espécimes) e melhoria na qualidade de análises das amostras de estudos clínicos e pré-clínicos de avaliação da resposta imune vacinal<sup>264,287</sup>.

Ademais, a necessidade de realização de ensaios de imunogenicidade para avaliar o desempenho das vacinas 17D e as vacinas em desenvolvimento para FA, reforça a importância de se ter métodos confiáveis (validados)<sup>268</sup>.

Atualmente buscam-se testes com essas propriedades, não somente para FA como para outros *Flavivirus*, como o vírus da dengue, em que estudos clínicos e pré-clínicos estão sendo conduzidos por diferentes grupos de pesquisa para a obtenção de uma vacina segura e eficaz contra o vírus.

No entanto, ainda não se tem um teste com essas características e com desempenho superior que justifique a sua utilização como teste referência para avaliação da resposta imune induzida por *Flavivirus* ou suas respectivas vacinas<sup>235,248,268,288</sup>.

Nesse contexto, o desenvolvimento de novas abordagens metodológicas para a determinação de anticorpos neutralizantes para FA está em consonância não somente com a necessidade de um teste confiável e que possa atender de forma eficaz a demanda de análise da resposta imune protetora após a vacinação, como também insere-se em um dos objetivos das Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz em desenvolver processos, produtos e metodologias na área de diagnóstico, epidemiologia e controle das doenças infecciosas e parasitárias.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O presente estudo visa otimizar metodologia já estabelecida e padronizar uma abordagem metodológica alternativa para a quantificação de anticorpos neutralizantes para o vírus da FA, para que ambos os testes de neutralização sejam submetidos à validação e à avaliação comparativa com o teste referência.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Otimizar a metodologia do micro PRNT com a determinação de critérios de aceitação para os controles do teste;
- Padronizar uma metodologia de quantificação de anticorpos neutralizantes para FA, denominada  $\mu$ PRN-HRP, a partir da determinação da condição de variáveis, como: tempos para o preparo das monocamadas celulares, neutralização e revelação do teste; origem e densidade celular; cepa viral e a sua diluição ideal; anticorpo monoclonal conjugado e a sua diluição;
- Calibrar soros candidatos a padrões dos testes de neutralização frente a um soro de referência internacional;
- Validar o micro PRNT e o  $\mu$ PRN-HRP a partir dos ensaios de precisão, exatidão, seletividade e robustez;
- Avaliar a concordância dos testes índices (micro PRNT e  $\mu$ PRN-HRP) com o teste referência (PRNT).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Soluções e Reagentes

- Verseno – solução estoque a 5%:  
50 g de EDTA dissódico;  
0,1 mL de vermelho de fenol a 1%;  
q.s.p. 1 L de água destilada.  
Preparo: misturar todos os reagentes e ajustar o pH para 7,6 com NaOH 1N.  
Estocar à temperatura ambiente.
- Tripsina – solução estoque a 5% (Gibco. Cat. #25300-054).
- Solução de tripsina/verseno:  
0,5 mL de tripsina (solução estoque);  
50 mL de verseno (solução estoque).  
Preparo: misturar os reagentes imediatamente antes do uso.
- Bicarbonato de sódio 4,4% gaseificado ( $\text{NaHCO}_3$ ):  
44 g de  $\text{NaHCO}_3$ ;  
1 mL de vermelho de fenol a 1%;  
q.s.p. 1 L de água bidestilada.  
Preparo: misturar todos os reagentes. Adicionar gelo seco com agitação até a solução atingir pH 7,0-7,2. Aliquotar em 20 mL e esterilizar na autoclave (121°C por 15 minutos). Estocar à temperatura ambiente.
- Soro fetal bovino inativado (Gibco. Cat. #12657-029).
- Solução de sulfato de gentamicina injetável 40 mg/mL (Hypofarma. Cat. #1203.0038/F).  
Preparo: adicionar 1 ampola (2 mL) em 18 mL de água bidestilada estéril.  
Manter a 2°C - 8°C.

- Anfotericina B (Gibco. Cat. #15290-018).
- Meio 199 com sais de Earle – estoque, concentrado 10X (Gibco. Cat. #31100-019).

Preparo: diluir o pó em água destilada estéril. Exemplo: 500 g para 5 L.

- Meio 199 com sais de Earle – para uso.

Reagentes	Sistema fechado (preparo de garrafas)	PRNT e micro PRNT (meio diluente)
Meio 199 com sais de Earle 10X	10%	10%
NaHCO <sub>3</sub> 4,4% (pH 7,0)	2,5%	5%
Soro fetal bovino inativado	5%	5%
Solução de sulfato de gentamicina	1%	1%
Anfotericina B	-	0,4%
Água destilada	q.s.p. 100 mL	q.s.p.100 mL

- Meio 199 com sais de Earle comercial (Gibco. Cat. #12340-030).
- Meio EMEM comercial (Lonza. Cat. #12-662Q).
- Carboximetilcelulose (CMC) (Sigma. Cat. #C4888).
- Meio semissólido (0,5% - 3%):  
0,5 g; 1,0 g; 1,5 g; 2 g; 2,5 g; ou 3 g de CMC;  
100 mL de Meio 199 com sais de Earle (para uso).  
Preparo: pesar e esterilizar o pó de CMC na autoclave (121°C por 15 minutos).  
Após esfriar, adicionar Meio 199. Colocar sob agitação até que o pó seja totalmente dissolvido.
- Solução de formaldeído a 5%:  
0,5 L de formaldeído 37% (Merck. Cat. #1.04003.1000);  
2,6 L de água destilada.  
Preparo: misturar os reagentes e estocar à temperatura ambiente.

- Cristal violeta – solução estoque a 2% (Merck. Cat. #1.15940.0025):  
10 g de cristal violeta;  
100 mL de metanol;  
q.s.p. 200 mL de água destilada.  
Preparo: misturar os reagentes e estocar à temperatura ambiente.
- Cristal violeta – solução de uso a 0,04%:  
20 mL da solução de cristal violeta a 2%;  
q.s.p. 1 L de água destilada.  
Preparo: misturar os reagentes e estocar à temperatura ambiente.
- Etanol absoluto  $\geq 99,5\%$  (Merck. Cat. #1.00983.1000).
- Metanol absoluto  $\geq 99,9\%$  (Merck. Cat. #1.06009.1000).
- Solução de etanol:metanol (1:1)  
0,5 L de etanol absoluto  $\geq 99,5\%$ ;  
0,5 L de metanol absoluto  $\geq 99,9\%$ .  
Preparo: misturar os reagentes e estocar a  $-30^{\circ}\text{C}$  por, pelo menos, 24 horas antes do uso.
- Soro albumina bovina – BSA 10% (KPL. Cat. #5140-0006 50-61-00).
- Bloqueador caseína em PBS 1% (ThermoFisher. Cat. #37528).
- Solução bloqueadora:  
5% de BSA;  
50% de bloqueador caseína em PBS;  
45% de água destilada.  
Preparo: primeiramente, aquecer a BSA em banho-maria (a  $37^{\circ}\text{C}$ , até que os cristais formados sejam dissolvidos). Misturar os reagentes imediatamente antes do uso.
- DPBS ("Dulbecco's phosphate-buffered saline") 1X (Gibco. Cat. #14190-136).

- Sorbitol 50% (Sigma. Cat. #W302902).
- Substrato True Blue (TB) – solução tamponada contendo 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (KPL. Cat. #50-78-02).
- Anticorpos monoclonais conjugados à enzima peroxidase: 4G2-HRP (anti-*Flavivirus*) e 2D12-HRP (anti-FA).

A produção e a dosagem de IgG total dos anticorpos monoclonais foram realizadas pelo Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais (LATAM/Bio-Manguinhos). A purificação dos anticorpos e as dosagens de proteína total foram realizadas pelo Laboratório de Macromoléculas (LAMAM/Bio-Manguinhos). O processo de conjugação à HRP foi realizado pelo Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED/Bio-Manguinhos).

Preparo (solução de uso): o anticorpo monoclonal conjugado deve ser mantido ao abrigo da luz e a 2°C - 8°C. Imediatamente antes do uso, dilui-se o anticorpo na solução bloqueadora (a diluição deve ser definida previamente à realização do teste e varia de acordo com o lote/concentração do anticorpo conjugado).

## 3.2 Soros e Considerações Éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/Fiocruz) pelo parecer nº 1.423.860 de 25 de fevereiro de 2016. CAAE 52793216.4.0000.5262.

Todos os soros foram previamente inativados por 30 minutos a 56°C e estocados a -20°C até a realização dos ensaios.

### 3.2.1 Soros Preparados Internamente

- Soro "M7" – oriundo de macaco rhesus (*Macaca mulata*) vacinado para FA e com alto título de anticorpos neutralizantes.
- Soro "AA61" – oriundo de macaco rhesus mas não vacinado e ausente de anticorpos para FA.

### **3.2.2 Soros Comerciais**

- Soro humano Sigma H4522 – a partir de plasma de indivíduos residentes nos Estados Unidos. Sigma-Aldrich. Número MDL: MFCD00165829.
- Soro referência internacional código NIBSC "YF"<sup>289</sup> – preparado a partir do pool de soros de macacos (*Cercopithecus aethiops tantalus*) imunizados com a cepa Asibi de FA. Cada ampola desse material contém 143 UI/mL de anticorpos para o vírus da FA.

### **3.2.3 Soros de Doadores Humanos**

- Soros de doadores do “Protocolo para Obtenção e Produção de Soros *in house* para Testes de Neutralização por Redução de Placas de Lise (PRNT)”. Protocolo CAAE 15120613.4.0000.5262 – Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/Fiocruz). Ano de coleta: 2013. Local de coleta: cidade do Rio de Janeiro.

Para o preparo dos soros padrões internos positivo ("P3") e negativo ("P1/100") (seção 3.2.4) e para os ensaios de validação dos testes de neutralização (seção 3.6), soros do estudo foram selecionados de acordo com os dados relacionados à experiência prévia para *Flavivirus* (dengue e FA) (quadro 3.1).

- Soros de doadores do estudo “Duração da Imunidade Após Duas ou Mais Doses de Vacina Contra Febre Amarela em Adultos”. Protocolo CAAE 15752013.1.0000.5240 – Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (Ensp/Fiocruz). Ano de coleta: 2014. Local de coleta: cidade do Rio de Janeiro. O estudo incluiu voluntários com apenas uma dose da vacina e que tinham recebido a mesma há, pelo menos, 10 anos, mas também vacinados com duas doses ou mais com diferentes tempos em relação à data da última dose recebida.

Para a realização dos ensaios de avaliação comparativa entre os testes de neutralização (seção 3.7), 200 soros do estudo clínico foram selecionados de forma cega (desconhecendo os títulos de anticorpos neutralizantes para FA determinados previamente) e aleatória, objetivando observações independentes e amplo espectro de resposta imune.

**Quadro 3.1:** Dados sobre a experiência prévia para *Flavivirus* (doença, vacina e título de anticorpos neutralizantes) de doadores dos soros selecionados.

identificação soro	DENGUE					FEBRE AMARELA	
	doença**	título de anticorpos neutralizantes (PRNT)*				vacinação**	título de anticorpos neutralizantes (micro PRNT)***
		dengue 1	dengue 2	dengue 3	dengue 4		
SIH007	sim (1x)	<16	<16	21	<16	sim	69
SIH008	não	<16	<16	<16	<16	sim	93
SIH014	não	340	297	153	157	sim	304
SIH017	sim (1x)	366	328	132	88	sim	409
SIH019	desconhece	<16	<16	<16	<16	sim	67
SIH020	sim (1x)	440	242	210	47	sim	640
SIH031	não	<16	<16	<16	<16	sim	640
SIH042	não	<16	<16	<16	<16	sim	203
SIH065	não	<16	<16	<16	<16	sim	297
SIH068	desconhece	635	184	92	109	sim	231
SIH071	desconhece	10650	3573	6498	1395	sim	156
SIH117	não	3361	2784	870	237	não	<5
SIH128	desconhece	<16	<16	<16	<16	sim	200
SIH129	desconhece	<16	<16	<16	<16	sim	94
SIH137	não	<16	<16	<16	<16	sim	237
SIH138	não	<16	<16	<16	33	sim	208
SIH139	não	<16	<16	<16	<16	sim	69
SIH141	não	<16	<16	<16	<16	não	640
SIH143	não	37	<16	<16	<16	sim	220
SIH144	não	58	<16	<16	<16	sim	124
SIH145	não	<16	<16	<16	<16	sim	108
SIH146	não	<16	<16	<16	78	não	146
SIH151	não	<16	<16	<16	<16	sim	468
SIH156	não	<16	<16	<16	<16	desconhece	95
SIH167	não	<16	<16	<16	29	sim	186
SIH172	não	822	1013	699	301	sim	208
SIH179	não	<16	<16	<16	<16	sim	161
SIH183	sim (1x)	144	1810	800	155	sim	< 5
SIH199	não	<16	<16	<16	<16	sim	188
SIH202	sim (1x)	2084	809	191	554	sim	422
SIH207	sim (1x)	62	219	677	115	sim	364
SIH208	sim (2x)	124	740	255	168	não	< 5
SIH228	não	186	3674	105	108	sim	495
SIH232	não	<16	21	<16	<16	não	35
SIH250	sim (1x)	<16	<16	<16	<16	sim	80
SIH252	desconhece	<16	<16	<16	<16	sim	117
SIH256	desconhece	<16	148	<16	<16	desconhece	10
SIH261	desconhece	<16	<16	<16	<16	sim	145
SIH268	não	<16	<16	<16	<16	sim	124
SIH269	não	<16	<16	<16	<16	sim	145
SIH271	sim (1x)	16048	3954	2640	357	sim	640
SIH282	não	<16	<16	<16	<16	sim	171
SIH285	não	<16	<16	<16	<16	sim	200
SIH289	não	<16	<16	<16	<16	sim	149

\* título de anticorpos neutralizantes, em recíproca da diluição, gerados pelo PRNT (em placas de 6 poços). Ensaios realizados no Latev no ano de 2014.

\*\* informação declarada pelo doador no questionário de inclusão no estudo.

\*\*\* título de anticorpos neutralizantes, em recíproca da diluição, gerados pelo micro PRNT. Ensaios realizados no Latev no ano de 2013.

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no programa WinPepi<sup>290</sup>. A utilização de 200 soros foi calculada com base nos seguintes parâmetros: coeficiente de correlação intraclasse igual ou maior a 0,8, com nível de significância de 5% e amplitude do intervalo de confiança de 0,1. Kappa esperado de 0,65 ou mais, considerando a frequência de soropositivos de 50%, com nível de significância de 5% e amplitude do intervalo de confiança de 0,2<sup>286</sup>.

### **3.2.4 Preparo dos Soros Padrões**

Os soros padrões internos (controles dos testes de neutralização) foram preparados a partir da união ("pool") de soros humanos selecionados do "Protocolo para Obtenção e Produção de Soros *in house* para Testes de Neutralização por Redução de Placas de Lise (PRNT)", de acordo com as informações descritas no quadro 3.1.

Para a obtenção do soro padrão positivo (P3), 8 soros foram selecionados: SIH031, SIH042, SIH065, SIH137, SIH138, SIH141, SIH143, SIH151. Estes foram homogeneizados em um tubo antes da distribuição em alíquotas menores para a utilização nos testes de neutralização.

O padrão negativo (P1/100) foi obtido da união de 7 soros: SIH007, SIH008, SIH019, SIH129, SIH139, SIH156, SIH250. Antes da distribuição em alíquotas menores, o "pool" foi diluído 100 vezes em meio a fim de obter um soro controle com mais baixo nível de anticorpos neutralizantes para FA.

## **3.3 Células**

Células Vero, uma linhagem de rim de macaco verde africano, foram utilizadas no presente estudo.

Células Vero ATCC (CCL 81) foram utilizadas na produção de vírus, nos ensaios de titulação e nos testes de neutralização. A cultura, em garrafas de 175 cm<sup>2</sup>, foi mantida em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, sem agitação, em Meio 199 com sais de Earle, tamponado com bicarbonato de sódio gaseificado, suplementado com soro fetal bovino inativado e antibiótico (sulfato de gentamicina 4 mg/mL).

Células Vero NIBSC (número de acesso: 011038) foram avaliadas no processo de padronização do  $\mu$ PRN-HRP (do inglês "micro Plaque Reduction Neutralization - Horseradish Peroxidase"). A cultura, em garrafas de 175 cm<sup>2</sup>, foi mantida em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, sem agitação, em Meio EMEM ("Eagle's minimal essential medium") comercial.

As linhagens eram submetidas a duas passagens semanais, onde as monocamadas foram tratadas com solução de tripsina/verseno a 1% em PBS por 5 minutos em estufa a 37°C. Uma vez dissociadas da monocamada, as células foram ressuspensas em 5 mL de Meio (199 ou EMEM) e sua quantidade estimada por contagem de uma alíquota em câmara de Neubauer para a confecção de placas ou garrafas nas densidades celulares desejadas.

### **3.4 Vírus**

A cepas vacinais 17D-213/77 (WHO) e 17DD (Bio-Manguinhos) foram utilizadas nos ensaios do presente estudo.

#### **3.4.1 Produções Virais**

##### **17DD**

Um lote de produção da cepa 17DD já havia sido realizado em biorreatores por outro grupo do Laboratório. Esta produção foi clarificada (centrifugação 10 minutos, 2000 rpm, 4°C; filtragem 0.22  $\mu$ m) e o título obtido (determinado pelo ensaio de placas, conforme descrito na seção 3.4.2) foi de 10<sup>6,27</sup> PFU/mL.

##### **17D-213/77**

Um frasco vacinal liofilizado da cepa 17D-213/77 (lote #11UEXVFB01) foi submetido a três passagens consecutivas em células Vero ATCC, concomitantemente à realização de uma cinética de crescimento viral.

Assim, garrafas (175 cm<sup>2</sup>) de células Vero ATCC (6,0 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>) foram preparadas 24 horas antes de serem infectadas. Imediatamente antes à infecção, o meio adicionado no dia anterior foi substituído por 5 mL de Meio 199 fresco, acrescido

do volume de vírus para um MOI (multiplicidade de infecção) de 0,002 (título:  $10^{6,9}$  PFU/mL. Inóculo: 220  $\mu$ L). As células infectadas foram incubadas por 1 hora na estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, 65 mL de Meio 199 foram adicionados às garrafas para, então, serem incubadas novamente (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

Três dias após a infecção, uma alíquota da garrafa infectada foi retirada para processá-la na RT-PCR em tempo real<sup>291</sup> para obter o título viral. A partir desta técnica foi possível calcular a MOI (0,002) e realizar, no mesmo dia, a segunda passagem do vírus em células Vero ATCC (preparadas nas mesmas condições descritas acima). Com título estimado de  $10^{6,74}$  PFU/mL (a partir da fórmula<sup>291</sup>:  $\text{Log}_{10} \text{PFU/mL} = 0,974 \times \text{Log}_{10} \text{cópias/mL} - 2,807$ ), um inóculo de 730  $\mu$ L da garrafa infectada 3 dias antes foi coletado para infectar a próxima garrafa de células Vero (as mesmas etapas pré- e pós-infecção descritas acima foram seguidas).

Quatro dias após a segunda infecção (7º dia da cinética de crescimento viral), repetiu-se todo o processo anterior com a retirada de uma alíquota para estimar o título viral por RT-PCR em tempo real ( $10^{7,14}$  PFU/mL), seguida da terceira infecção viral em células Vero ATCC (inóculo de 292  $\mu$ L).

Após a terceira infecção da cepa 17D-213/77, as monocamadas foram mantidas em estufa (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) por mais 8 dias, completando 15 dias da cinética de crescimento viral. Além das monocamadas terem sido monitoradas no microscópio para a visualização de efeito citopático (CPE), diariamente uma alíquota (0,5 mL) era retirada da garrafa infectada para a quantificação de PFU/mL pelo ensaio de placas (protocolo descrito na seção 3.4.2).

Do 3º ao 7º dia após a 3ª infecção, mais uma alíquota diária (3 mL) passou a ser coletada. Estas, antes de serem estocadas a -80°C, foram submetidas aos processos de centrifugação (10 minutos, 2000 rpm, 4°C) e filtragem do sobrenadante (filtro 0.22  $\mu$ m).

Vírus devem ser coletados do meio para o final da fase exponencial de crescimento para evitar concentrações altas de partículas inativadas na preparação viral<sup>227</sup>. Os resultados obtidos pelo ensaio de placas para cada dia da cinética de crescimento viral indicou o estoque viral do 3º dia após a 3ª passagem em células Vero com o título ideal para produzir um banco de vírus ( $10^{7,59}$  PFU/mL).

Para as produções dos bancos máster e de trabalho da cepa 17D-213/77, o mesmo protocolo realizado para a cinética de crescimento viral foi seguido (preparo, infecção e manutenção das células Vero ATCC; coleta, clarificação e armazenamento

do preparado viral). Antes de serem aliquotados (tubos de 0,6 mL cada) e estocados a -80°C, ambos os bancos foram adicionados do estabilizador sorbitol 8%.

O banco máster foi obtido da coleta (no 3º dia após a infecção) do sobrenadante da cultura contendo vírus, a partir do inóculo de 63 µL. O banco de trabalho, produzido a partir de uma alíquota do banco máster, foi coletado no 4º dia após a infecção (quando foi observado intenso comprometimento das monocamadas com a visualização de CPE), com inóculo de 69 µL.

### **3.4.2 Titulação Viral**

O ensaio de placas foi realizado para a determinação do título viral em PFU/mL. Placas de 6 poços foram preparadas com células Vero ATCC na densidade de  $3,33 \times 10^5$  células/mL no dia anterior ao teste.

Alíquotas virais foram escolhidas aleatoriamente e descongeladas rapidamente em água corrente para serem diluídas em Meio 199 de forma seriada (fator 2 de diluição). Em seguida, todo o Meio 199 presente nas placas de 6 poços preparadas 24 horas antes foi aspirado cuidadosamente (evitando a danificação das monocamadas de células) para a adição, em triplicata, de 200 µL/poço de cada diluição das alíquotas virais. Para a ocorrência do processo de adsorção, as monocamadas foram incubadas por 1 hora (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Após esse período, o conteúdo líquido foi substituído por 3 mL/poço do meio semissólido (carboximetilcelulose a 3%) e as monocamadas foram incubadas novamente (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) por 7 dias.

Após os 7 dias, as monocamadas foram fixadas com formol a 5%, lavadas com água e coradas com cristal violeta a 0,04%, para que as placas de lise formadas fossem contadas manualmente em um transiluminador.

O seguinte cálculo foi realizado para a determinação do título viral em log<sub>10</sub> PFU/mL: log<sub>10</sub> do nº de placas de lise + log<sub>10</sub> da diluição correspondente + log<sub>10</sub> 5 (fator de correção para 1 mL – inóculo de 200 µL).

### **3.4.3 Determinação da Diluição Viral para os Ensaios de Neutralização**

A diluição ideal do vírus para os ensaios de neutralização resulta em quantidade ótima de placas de lise na área do poço; isto é, aquela diluição que possibilita a individualização (sem sobreposição) das placas de lise, evitando

contagem subjetiva e variável entre operadores e/ou equipamentos, e resulta em baixa dispersão entre as replicatas do controle viral.

A determinação da diluição viral ideal deve ser realizada sempre que um novo lote de vírus é produzido e para cada protocolo de teste de neutralização. Portanto, essa determinação pode variar de acordo com a cepa viral e seu respectivo título, mas também a metodologia de quantificação de anticorpos neutralizantes.

Para determinar a diluição do vírus, este deve ser submetido a todas as etapas do teste de neutralização, a partir de diluições seriadas do próprio vírus em meio diluente.

A determinação da diluição ideal da cepa 17D-213/77 fez parte do processo de otimização da técnica do micro PRNT. Ensaios foram realizados variando a forma de diluir o vírus: diluições seriadas na própria placa de 96 poços; ou diluições em tubos para, posteriormente, serem adicionados aos poços da microplaca. A determinação da diluição viral também foi condicionada à avaliação de diferentes variáveis: tempo de neutralização; variações entre as replicatas e a quantidade média de PFU/poço do controle de vírus; e títulos de anticorpos neutralizantes confrontados com diferentes quantidades de vírus. O protocolo do micro PRNT (descrito na seção 3.5.2) foi seguido para a determinação da diluição viral ideal.

A determinação da diluição viral ideal para o  $\mu$ PRN-HRP fez parte da padronização da técnica para FA. Diversos ensaios testando diferentes diluições do vírus foram realizados ao longo desse processo em que se avaliou diferentes variáveis e condições (detalhes na seção 3.5.3).

Três ensaios independentes foram realizados para a determinação da diluição ideal da cepa 17D-213/77 para o PRNT. Em cada ensaio, 2 alíquotas do banco de trabalho foram escolhidas aleatoriamente para serem processadas de acordo com o protocolo descrito na seção 3.5.1.

## **3.5 Testes de Neutralização**

### ***3.5.1 PRNT – Teste Referência (placa 6 poços)***

O PRNT em placas de 6 poços foi considerado o teste referência no presente estudo e o seu protocolo de execução já estava estabelecido no LATEV<sup>286</sup>. Esta

metodologia foi realizada para os ensaios de calibração dos soros padrões internos e os de avaliação comparativa com os testes em placas de 96 poços.

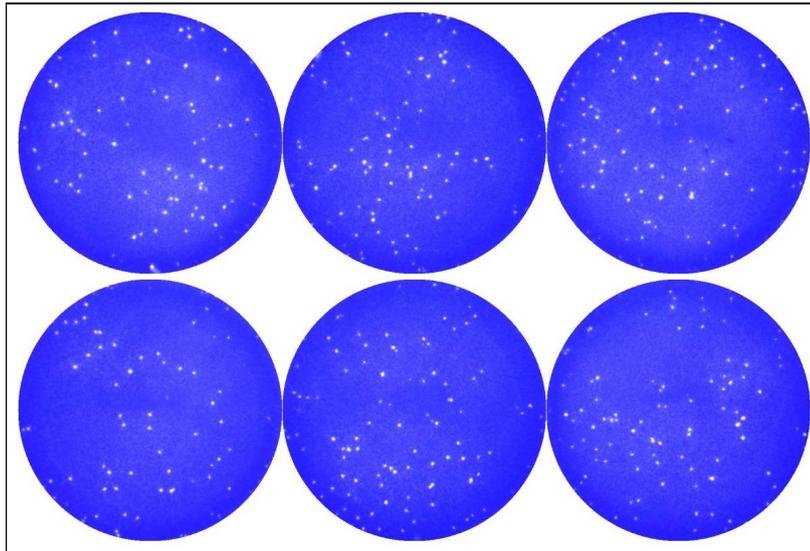
Primeiramente, diluições seriadas de fator 2 em meio diluente (Meio 199) dos soros foram realizadas em placas de 24 poços, de modo a obter 6 diluições de cada soro, em volume final de 300 µL: diluição inicial 1:20 (30 µL de soro + 570 µL de meio) a diluição final 1:640 (300 µL de soro + 300 µL de meio). Após essa etapa, 300 µL da suspensão viral preparada imediatamente antes do início do teste (diluição ideal predeterminada para obtenção de, aproximadamente, 90 placas de lise/poço) foram adicionados a cada diluição dos soros, obtendo volume final de 600 µL em cada poço. Para os controles de vírus, adicionou-se 1 mL/poço da suspensão viral + 1 mL/poço de Meio 199. Para a etapa de neutralização, as placas de 24 poços contendo as misturas descritas foram mantidas por 1 hora em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Após esse período, todo o meio diluente presente nas placas de 6 poços (semeadas 24 horas antes com células Vero ATCC na densidade 3,3 x 10<sup>5</sup> células/mL) foi aspirado cuidadosamente para a adição de 200 µL/poço de cada mistura (soro diluído + vírus ou meio diluente + vírus). Foi reservada uma placa inteira de 6 poços para o controle viral e outra para o controle de células. Para a etapa de adsorção, as monocamadas foram incubadas por 1 hora em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

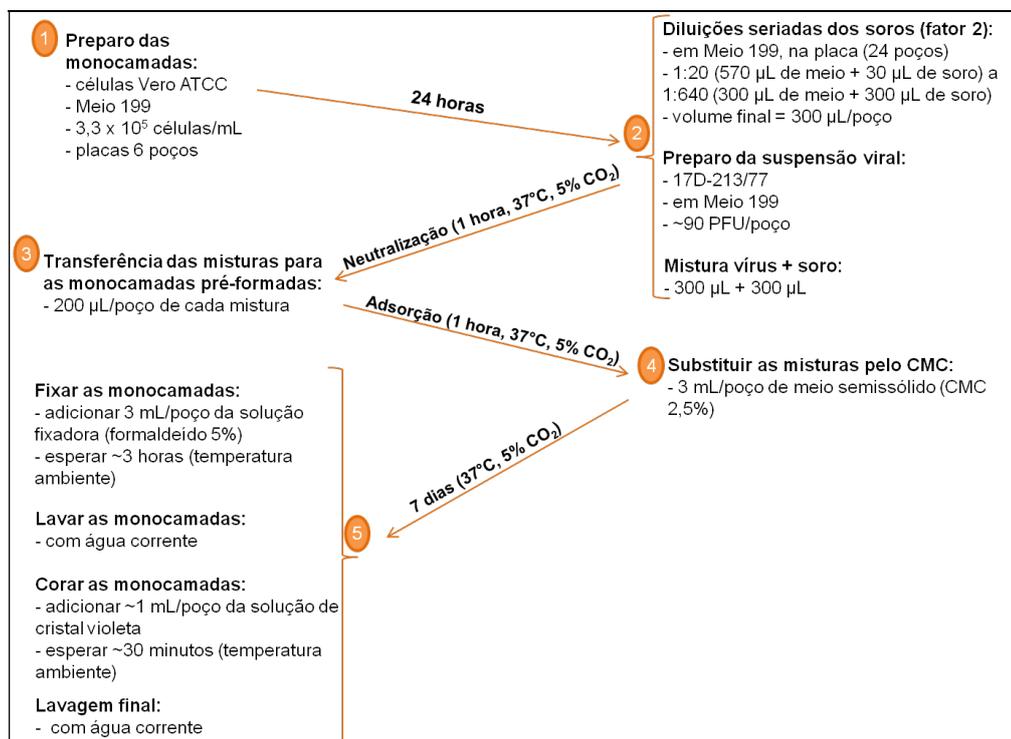
Em seguida, as misturas foram aspiradas e substituídas por 3 mL/poço de meio semissólido (CMC 2,5% à temperatura ambiente) para que as monocamadas fossem incubadas novamente por 7 dias (37°C e 5% de CO<sub>2</sub>).

Após a incubação, as monocamadas foram fixadas por, pelo menos, 3 horas à temperatura ambiente com 3 mL/poço de formaldeído (5%), lavadas cuidadosamente com água corrente para a retirada completa do meio semissólido e coradas com cristal violeta (0,04%) por 30 minutos (volume suficiente para cobrir as monocamadas). As monocamadas foram mantidas em estufa (37°C) até que estivessem completamente secas para que as placas de lise formadas fossem contadas manualmente no transiluminador.

Na figura abaixo (3.1), foto representativa de placa resultante da metodologia do PRNT, resumida na figura 3.2.



**Figura 3.1: Placa de 6 poços representativa do PRNT de FA.**  
Foto da placa de controle viral (6 replicatas). A cepa 17D-213/77 foi submetida à diluição em Meio 199 para a obtenção de, aproximadamente, 90 placas de lise/poço. Foto BioSpot.



**Figura 3.2: Esquema do protocolo de execução do PRNT de FA.**  
Etapas da metodologia do PRNT de FA. Tempo total do teste: 9 dias.

### **3.5.2 Micro PRNT – placa 96 poços**

Apesar da metodologia em placas de 96 poços já estar estabelecida no LATEV<sup>286</sup> desde a década de 1990 e ser utilizada nas rotinas de avaliação das respostas de anticorpos neutralizantes para FA, ainda não se tinha dados sobre os critérios de aceitação do teste.

O processo de otimização do micro PRNT foi baseado na determinação das faixas de aceitação para o número de placas de lise por poço no controle viral do teste e para os títulos de anticorpos neutralizantes dos soros padrões internos. O tempo de neutralização, as variações observadas no controle viral e o impacto de diferentes quantidades de vírus nos títulos de anticorpos neutralizantes foram variáveis avaliadas durante o processo de otimização da metodologia.

Inicialmente, foram realizados ensaios onde somente o vírus foi submetido às etapas do micro PRNT para a determinação da diluição viral ideal. A quantidade média de, aproximadamente, 30 placas de lise por poço (ou 30 PFU/poço) já havia sido definida como a ideal para o controle de vírus<sup>292</sup>. Ensaios simulando o micro PRNT foram realizados onde o vírus (duas alíquotas do banco de trabalho por ensaio) foi submetido à diluição seriada de fator 2 na própria placa (1:10 a 1:5120). Em um segundo momento, ensaios foram realizados testando quatro diluições virais preparadas previamente em tubos (1:1250; 1:2500; 1:5000; 1:10000) e, então, adicionadas aos poços das placas, prática mais próxima da metodologia do micro PRNT quando se utiliza soros para a determinação dos anticorpos neutralizantes.

Posteriormente, ensaios de micro PRNT utilizando soros com diferentes níveis de anticorpos neutralizantes para FA foram realizados não somente para definir a diluição viral ideal para uma determinada quantidade de placas de lise por poço (30 PFU/poço), mas estabelecer a faixa de aceitação para esta quantidade – isto é, as quantidades (médias) mínima e máxima de PFU/poço no controle viral – considerando os títulos de anticorpos neutralizantes obtidos a partir da mistura do soro com diferentes quantidades de vírus.

O tempo de neutralização também pode impactar na quantidade de placas de lise por poço e na variabilidade dos títulos de anticorpos. Portanto, a análise dessa variável foi incluída no processo de determinação da faixa aceitável de placas de lise por poço e a diluição viral correspondente.

Para esses ensaios, utilizou-se o soro "M7" diluído de três maneiras em soro negativo (comercial SIGMA): 10 ("M7/10"), 30 ("M7/30") e 50 ("M7/50") vezes; e

testou-se: a) quatro diluições virais em tubos (1:1250; 1:2500; 1:5000; 1:10000); b) dois tempos de neutralização (1 e 2 horas).

Para facilitar a compreensão dos dados obtidos de diferentes variáveis em diversos ensaios e testando dois tempos de neutralização, a análise foi dividida em 2 etapas: 1<sup>a</sup>) avaliar a quantidade média de placas de lise por poço e a dispersão das replicatas dos controles virais de cada diluição do vírus testada; 2<sup>a</sup>) avaliar os títulos de anticorpos neutralizantes presentes em um soro confrontado com diferentes concentrações de vírus.

Os seguintes critérios foram considerados na análise dos dados: visualização e clareza na contagem das placas de lise obtidas; coeficiente de variação (CV) – uma medida de dispersão relativa definida como a razão do desvio padrão pela média – das replicatas dos controles virais; variação de até 3 vezes dos títulos médios de anticorpos neutralizantes.

A definição da faixa de aceitação para o número de placas de lise por poço no controle viral foi utilizada como critério de aceitação para os próximos ensaios de micro PRNT (calibração dos soros padrões, validação e avaliação comparativa com o teste referência).

A primeira etapa dos ensaios de micro PRNT consistiu na diluição seriada de fator 2 dos soros amostrais e os soros controles. Meio 199 foi adicionado em todos os poços da microplaca seguido da adição dos soros, de modo que a primeira diluição foi iniciada em 1:5 (20 µL de soro + 80 µL de meio) e prosseguiu-se de maneira seriada até a diluição 1:640 (50 µL de soro + 50 µL de meio), no volume final de 50 µL/poço. Assim, para cada soro foram obtidas 8 diluições.

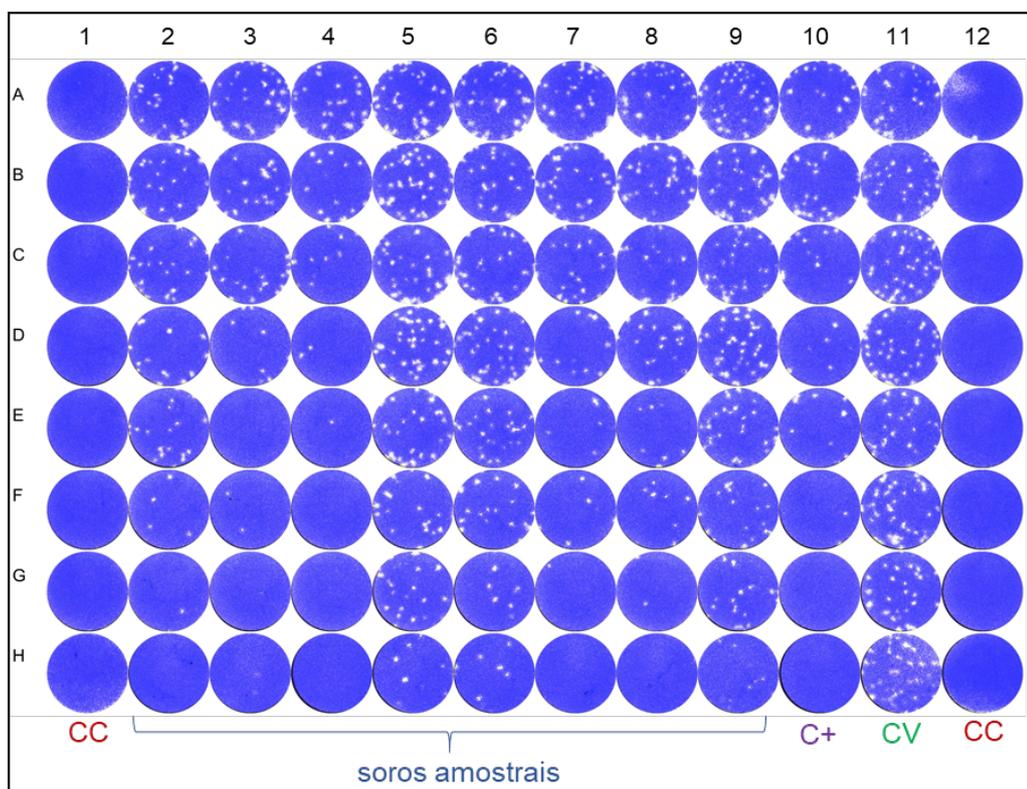
Para a etapa de neutralização, 50 µL/poço da suspensão viral preparada no momento do uso foram adicionados aos 50 µL das diluições dos soros. Em todas as placas do mesmo ensaio, uma coluna (8 poços) foi destinada à diluição seriada do soro padrão (positivo ou negativo), outra destinada ao controle de vírus (vírus + meio) e as duas colunas localizadas nas bordas da placa para o controle de células (somente meio).

Após incubação em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, 50 µL de suspensão de células Vero (preparada no momento do uso na densidade de  $1,6 \times 10^6$  células/mL) foram adicionados a cada orifício da placa. Para a etapa de adsorção dos vírus não neutralizados, as monocamadas foram novamente incubadas por 3 horas (37°C e 5% de CO<sub>2</sub>). Em seguida, o sobrenadante foi substituído por 100 µL/poço do meio

semissólido (2,5%) para a incubação das monocamadas por 6 dias (37°C e 5% de CO<sub>2</sub>).

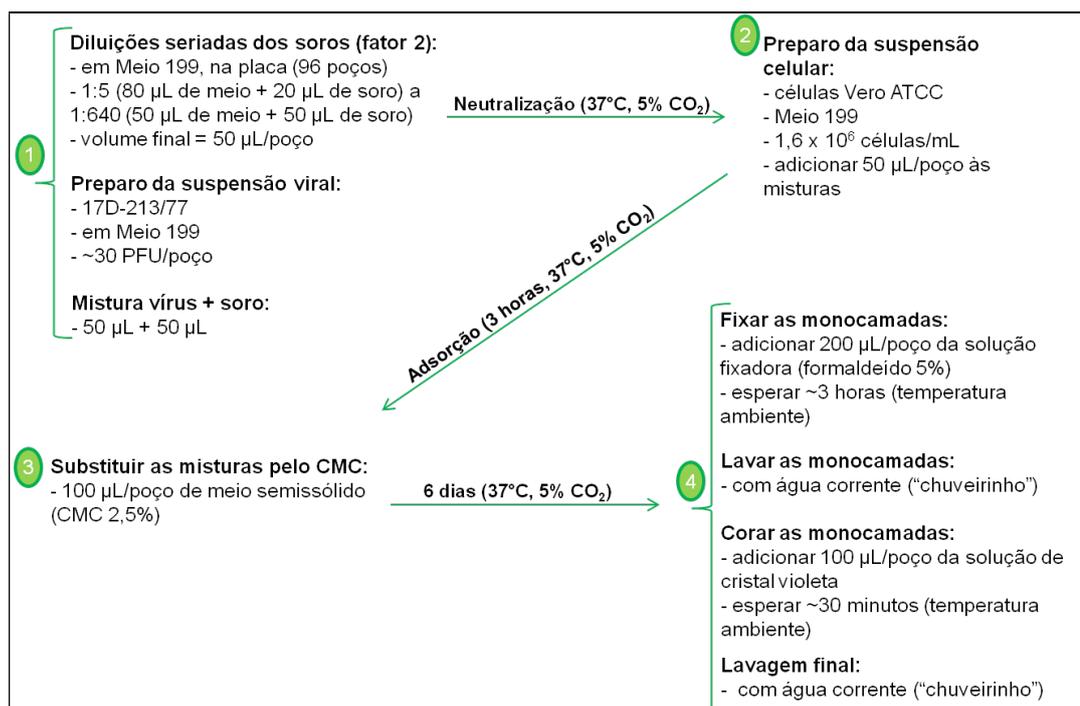
Após esse período, as monocamadas foram fixadas por, pelo menos, 3 horas à temperatura ambiente com 200 µL/poço de formaldeído (5%), lavadas cuidadosamente com água corrente para a retirada completa do meio semissólido e coradas com 100 µL/poço de cristal violeta (0,04%) por 30 minutos. As monocamadas foram mantidas em estufa (37°C) até que estivessem completamente secas para que as placas de lise formadas fossem contadas manualmente no BioSpot (CTL Biospot).

Na figura abaixo (3.3), foto representativa de placa resultante da metodologia do micro PRNT, resumida na figura 3.4.



**Figura 3.3: Placa representativa do micro PRNT de FA.**

Foto da placa de 96 poços resultante do micro PRNT de FA. Colunas 2 a 9 = destinadas ao processamento de soros amostrais submetidos às diluições seriadas de fator 2 em Meio 199 (1:5 a 1:640, da linha H para A). Coluna 10: C+ = controle padrão positivo (P3). Coluna 11: CV = controle de vírus. Colunas 1 e 12: CC = controle de células. Foto BioSpot.



**Figura 3.4: Esquema do protocolo de execução do micro PRNT de FA.**  
 Etapas da metodologia do micro PRNT de FA. Tempo total do teste: 7 dias.

### 3.5.3 µPRN-HRP – placa 96 poços

O protocolo de execução do µPRN-HRP foi determinado no processo de padronização da metodologia para FA, realizada em colaboração com a GlaxoSmithKline (GSK)/Bélgica. O ensaio para FA baseou-se no protocolo desenvolvido e validado pela GSK para a quantificação de anticorpos neutralizantes para os quatro sorotipos do vírus da dengue. O teste, que teve a sua transferência de tecnologia para Bio-Manguinhos iniciada em 2011, foi desenvolvido para a análise das amostras de estudos clínicos de avaliação da eficácia da vacina para dengue proposta pela GSK.

Apesar do racional e as etapas do teste já terem sido determinados para outro *Flavivirus*, era necessário avaliar as variáveis da metodologia e suas diferentes condições especificamente para a determinação de anticorpos neutralizantes para FA, ou seja, “padronizar” o teste para FA.

Como o termo “padronização”, utilizado neste trabalho, pode suscitar dúvidas, pertinente, aqui, abrir um breve parêntese para melhor esclarecer o significado da expressão.

Diferentemente do termo “desenvolvimento”, utilizado para denominar a criação de uma nova técnica, a “padronização” consistiu em adaptar o conhecimento existente à quantificação de anticorpos neutralizantes para FA.

Assim, o processo de padronização envolveu todas as etapas do teste: preparo das monocamadas celulares, diluição seriada dos soros, neutralização com uma concentração fixa e preestabelecida do vírus e adsorção às células Vero; além das etapas de revelação do tipo imunoenzimática: fixação das monocamadas, tratamento com um anticorpo monoclonal conjugado à enzima peroxidase para o reconhecimento dos vírus não neutralizados, adição de um substrato da enzima e as lavagens necessárias entre as etapas de revelação. A padronização do teste foi concluída com a determinação dos parâmetros de contagem de PFU – visualizadas com coloração de tom azul devido à adição do reagente True Blue (TB) – do software de processamento automatizado de imagens (Axiovision), após terem sido fotografadas (também de forma automatizada) no equipamento ScanLab (equipamento composto por uma máquina fotográfica acoplada a um microscópio).

Portanto, a metodologia do  $\mu$ PRN-HRP de FA foi definida ao longo do processo de padronização, como parte dos objetivos do presente estudo. O resultado foi a obtenção do seu protocolo de execução a partir da avaliação das variáveis e suas respectivas condições descritas no quadro 3.2.

A padronização do  $\mu$ PRN-HRP foi iniciada com uma avaliação exclusivamente qualitativa (visual) das variáveis fundamentais do teste: origem do banco das células Vero; tempo de preparo das monocamadas pré-formadas; densidade celular; cepa viral; tempo para revelação do teste; e o anticorpo monoclonal. Essas variáveis foram avaliadas concomitantemente, organizadas em 4 grupos de acordo com a combinação tipo de célula Vero e a cepa viral:

- I) célula Vero ATCC (Meio 199) X vírus 17D-213/77;
- II) célula Vero ATCC (Meio 199) X vírus 17DD;
- III) célula Vero NIBSC (Meio EMEM) X vírus 17D-213/77;
- IV) célula Vero NIBSC (Meio EMEM) X vírus 17DD.

**Quadro 3.2:** Condições testadas das variáveis do  $\mu$ PRN-HRP de FA avaliadas na padronização.

VARIÁVEIS	CONDIÇÕES TESTADAS
células Vero	ATCC NIBSC
tempo preparo monocamadas pré-formadas	24 horas 48 horas
densidade celular	1,0 x 10 <sup>5</sup> células/mL 2,0 x 10 <sup>5</sup> células/mL 3,0 x 10 <sup>5</sup> células/mL 4,0 x 10 <sup>5</sup> células/mL 5,0 x 10 <sup>5</sup> células/mL 6,0 x 10 <sup>5</sup> células/mL
cepa viral	17D-213/77 17DD
diluição viral	10 <sup>-1</sup> a 10 <sup>-7</sup>
tempo neutralização	1 hora 1 hora e 30 minutos 2 horas
concentração do meio semissólido	0,5% 1,0% 1,5% 2,0% 2,5%
tempo (pós-infecção) para revelação do teste	24 horas 36 horas 48 horas 72 horas 96 horas
solução fixadora	formaldeído etanol:metanol
anticorpo monoclonal conjugado (HRP)	2D12 4G2
diluição do anticorpo monoclonal conjugado	1:500 1:1000 1:1500 1:2000 1:3000

Posteriormente, outras variáveis foram analisadas de maneira qualitativa e/ou quantitativa: diluição viral, tempo de neutralização, concentração do meio semissólido, solução fixadora e diluição do anticorpo monoclonal conjugado.

Para a análise quantitativa, as imagens obtidas no ScanLab foram transferidas para o Axiovision para a contagem de PFU de FA. A definição dos parâmetros de reconhecimento e contagem do PFU de FA pelo software (denominado “teaching and reading”) também fez parte do processo de padronização da técnica.

As variáveis e suas respectivas condições foram avaliadas a partir de ensaios em que somente o vírus foi processado ou testando soros com diferentes níveis de anticorpos neutralizantes (M7; M7/10 e AA61), seguindo o racional predefinido para as etapas da metodologia.

Primeiramente, adicionou-se meio diluente em todos os orifícios da placa de 96 poços para a realização da diluição seriada de fator 3 dos soros (volume final de 120  $\mu\text{L}$ /poço). Uma coluna foi reservada para o controle de vírus (meio + suspensão viral) e as bordas da microplaca para o controle de células (somente meio). Para cada soro 6 diluições foram obtidas.

Uma suspensão viral foi preparada no momento do uso, na diluição ideal para a obtenção de, aproximadamente, 70 PFU/poço no controle de vírus. Para a etapa de neutralização, 120  $\mu\text{L}$ /poço da suspensão viral foram adicionados aos 120  $\mu\text{L}$  das diluições dos soros ou aos 120  $\mu\text{L}$  de meio (controle de vírus). As misturas foram incubadas em estufa a 37°C e 5%  $\text{CO}_2$ .

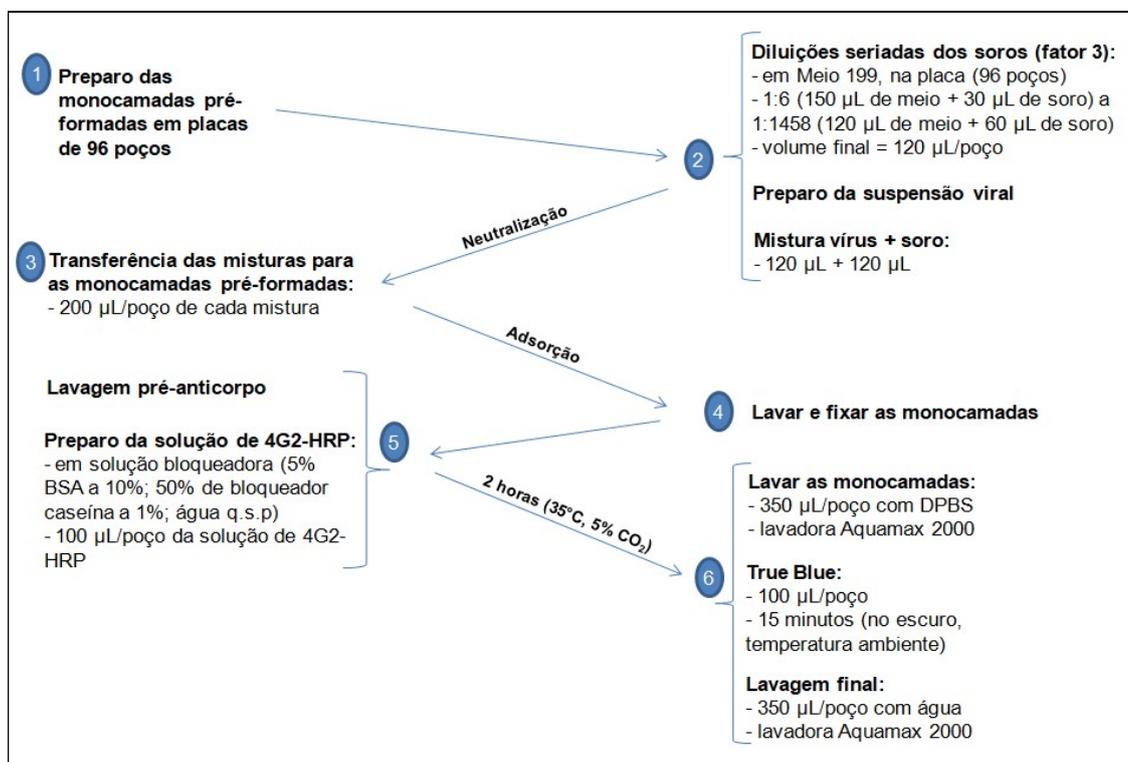
Após a incubação, 200  $\mu\text{L}$  de cada mistura foram transferidos para a placa de 96 poços contendo as monocamadas pré-formadas para que ocorresse a adsorção em estufa a 37°C e 5%  $\text{CO}_2$ .

Após o período de incubação, as monocamadas foram submetidas à fixação (250  $\mu\text{L}$ /poço) por, pelo menos, 1 hora e lavagens para a adição de 100  $\mu\text{L}$ /poço do anticorpo monoclonal conjugado diluído, no momento do uso, na solução bloqueadora (bloqueador caseína, BSA 10% e água destilada).

Após 2 horas de incubação em estufa a 35°C e 5% de  $\text{CO}_2$ , as monocamadas foram lavadas com DPBS (300  $\mu\text{L}$ /poço) em lavadora automática (AquaMax 2000) antes de adicionar o substrato TB (100  $\mu\text{L}$ /poço). Após 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente, as monocamadas foram lavadas novamente com água destilada (300  $\mu\text{L}$ /poço. AquaMax 2000) e, quando estavam completamente secas, foram fotografadas de forma automatizada no ScanLab. As imagens geradas foram transferidas para o Axiovision para a contagem automatizada de PFU de FA.

A definição do protocolo de execução do  $\mu\text{PRN-HRP}$  permitiu a realização dos ensaios seguintes (calibração dos soros padrões, validação e avaliação comparativa

com o teste referência). Na figura abaixo (3.5), esquema geral das etapas do teste antes da definição das condições das variáveis.



**Figura 3.5: Esquema geral do protocolo de execução do  $\mu$ PRN-HRP de FA.**

As condições das variáveis foram definidas ao longo do processo de padronização da metodologia.

### 3.5.4 Cálculo do Título de Anticorpos Neutralizantes

O título de anticorpos presentes no soro foi determinado considerando o “end-point” de 50% ( $EP_{50}$ ). O  $EP_{50}$  é o ponto onde há redução de 50% do número das placas de lise obtidas no controle de vírus do teste. Seu valor é calculado da seguinte forma: média aritmética do número de placas de lise obtidas nas replicatas do controle de vírus multiplicada por 0,5.

Assim, o título de anticorpos neutralizantes foi definido como a recíproca da última diluição do soro que reduziu o número de placas de lise em 50%.

O título de anticorpos neutralizantes (em recíproca da diluição) foi calculado por regressão linear, por interpolação das diluições correspondentes ao número de placas de lise imediatamente acima e abaixo do EP<sub>50</sub> determinado para o teste. Veja abaixo exemplo hipotético de um soro submetido às diluições seriadas (fator 2) de 1:5 a 1:640, onde o teste apresentou EP<sub>50</sub> = 18.

diluição do soro	nº placas de lise	
1:160	21	$\xrightarrow{\hspace{2cm}}$
1:80	14	
título de anticorpos neutralizantes (recíproca da diluição) = <b>127</b>		

A transformação do título de anticorpos neutralizantes em mUI/mL foi realizada de acordo com o título de anticorpos do soro padrão positivo (P3), a partir dos seguintes cálculos:

1º) determinação da constante Z

$$Z = \frac{V}{X}$$

Onde,

V = valor nominal, em mUI/mL, do soro padrão positivo.

X = título do soro padrão positivo, em recíproca da diluição, correspondente ao EP<sub>50</sub> determinado para o teste.

2º) determinação do título de anticorpos em mUI/mL

$$T = Z \times S$$

Onde,

T = título de anticorpos neutralizantes, em mUI/mL, do soro.

Z = constante do teste.

S = título do soro, em recíproca da diluição, correspondente ao EP<sub>50</sub> determinado para o teste.

### **3.5.5 Testes de Calibração dos Soros Padrões**

O soro P3, candidato a controle padrão positivo, foi calibrado frente ao soro de referência internacional da NIBSC (“YF”) para a determinação dos seus valores nominais (em mUI/mL) nos três testes de neutralização.

Foram realizados três ensaios de cada metodologia com 10 replicatas do P3, totalizando 30 resultados. A transformação de cada título obtido (em recíproca da diluição) para mUI/mL foi realizada de acordo com os títulos de anticorpos presentes no soro referência “YF” e conforme descrito na seção anterior (3.5.4). O TMG dos 30 resultados (em mUI/mL) foi definido como valor nominal do soro padrão positivo.

O mesmo processo foi realizado para o soro candidato a padrão negativo P1/100. Foram realizadas 30 replicatas (10 por ensaio) para cada teste de neutralização.

A partir dos 30 resultados, em recíproca da diluição, determinou-se a faixa de aceitação de títulos dos soros padrões positivo e negativo, em cada metodologia, considerando o TMG e a sua respectiva variação de até 3 vezes.

## **3.6 Validação dos Testes Índices**

A partir da otimização do micro PRNT e a padronização do  $\mu$ PRN-HRP, realizou-se a validação dos testes aplicados em placas de 96 poços, seguindo as normas estabelecidas pela Resolução vigente da ANVISA, com a determinação dos seguintes parâmetros: precisão, exatidão, seletividade e robustez.

Soros do estudo “Protocolo para Obtenção e Produção de Soros *in house* para Testes de Neutralização por Redução de Placas de Lise (PRNT)” foram selecionados considerando os dados disponíveis (quadro 3.1 – seção 3.2.3) e de modo a atender à necessidade de cada teste de validação.

As análises foram realizadas a partir dos títulos em  $\text{Log}_{10}$  da recíproca da diluição.

### **3.6.1 Precisão (ou confiabilidade)**

Definida como a capacidade do teste produzir resultados similares de uma mesma amostra processada diversas vezes<sup>293</sup>.

A precisão intraensaio (ou repetibilidade) foi avaliada sob condições variáveis mínimas. Isto é, a mesma amostra testada várias vezes (replicatas) pelo mesmo operador, no mesmo ensaio, na mesma placa e com o mesmo lote de reagentes.

A precisão interensaio (ou precisão intermediária) foi determinada sob condições diferentes, mimetizando o ensaio de rotina. A variabilidade foi medida em dias diferentes, por operadores diferentes, com o mesmo lote de reagentes.

#### **Testes:**

- Intraensaio: seis replicatas de 16 soros com diferentes níveis de anticorpos neutralizantes foram processados em um mesmo ensaio realizado pelo mesmo operador<sup>270</sup>.
- Interensaio: dois operadores repetiram o procedimento descrito acima (intraensaio) em três ensaios independentes. Cada ensaio foi realizado sem que o operador soubesse dos resultados obtidos anteriormente<sup>270</sup>.

#### **Análises:**

- Intraensaio: para cada soro foi determinado o título médio geométrico (TMG) das suas replicatas. Pelo menos 5 (90%) dos 6 títulos obtidos não deveriam variar mais que 3 vezes, para mais ou para menos, o valor do seu TMG ( $\pm 0,48$ .  $\text{Log}_{10} 3 = 0,477$ ). O teste foi considerado com precisão intraensaio se, no mínimo, 13 (80%) das 16 amostras testadas alcançassem esse critério<sup>268</sup>.
- Interensaio A (mesmo operador, ensaios diferentes): a partir dos 12 títulos obtidos do soro (6 replicatas X 2 ensaios) foi determinado o  $\text{TMG} \pm 0,48$ . Somente 1 título (~ 10%) entre os 12 poderia estar fora da faixa de variação calculada. Pelo menos 13 (80%) dos 16 soros testados deveriam ter alcançado esse critério para se considerar a precisão interensaio do teste<sup>268</sup>.
- Interensaio B (operadores diferentes, ensaios diferentes): a partir dos 18 títulos obtidos do mesmo soro (6 replicatas X 3 ensaios) foi determinado o  $\text{TMG} \pm 0,48$ . Somente 2 resultados (~ 10%) dos 18 poderiam estar fora da faixa de títulos determinada para aquele soro. No mínimo, 13 (80%) dos 16 soros testados deveriam ter alcançado esse critério<sup>268</sup>.

- Complementando as análises de precisão, determinou-se os coeficientes de variação (CV%) das replicatas de cada soro, os quais não poderiam superar os 15%<sup>270</sup>.

**Soros:**

SIH202, SIH228, SIH017, SIH271, SIH250, SIH008, SIH269, SIH071, SIH172, SIH068, SIH256, SIH129, SIH232, SIH139, SIH144, SIH268.

### **3.6.2 Exatidão (ou capacidade de diluição)**

Determina o grau de concordância entre os títulos observado e esperado para um determinado soro, a partir do processamento simultâneo das suas formas íntegra (não diluída) e submetida a diferentes diluições<sup>268</sup>.

**Testes:** o soro padrão interno (P3) e mais 3 soros com altos títulos de anticorpos neutralizantes para FA foram processados no mesmo ensaio em suas formas íntegras e diluídas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 para o soro P3; 1:4, 1:8, 1:16 para os outros 3 soros) no soro padrão interno negativo (P1/100), gerando 14 amostras (soros diluídos) a serem processadas. Cinco replicatas de cada apresentação amostral foram aplicadas no ensaio<sup>268</sup>.

**Análises:** determinou-se para cada um dos 4 soros avaliados os TMGs esperados: a partir da média geométrica obtida das 5 replicatas do soro íntegro (não diluído), dividida pelos fatores de diluição propostos (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32). Os TMGs obtidos no ensaio dos soros nas suas apresentações diluídas foram classificados como observados. Os TMGs observados e esperados foram transformados em  $\text{Log}_{10}$  para a determinação da diferença absoluta entre eles. Esta não deveria ser maior que 0,477 (ou 3 vezes.  $\text{Log}_{10} 3 = 0,477$ ), em pelo menos, 80% (11 de 14) das amostras testadas<sup>268</sup>.

**Soros:**

P3, SIH020, SIH128, SIH167.

### **3.6.3 Seletividade (ou especificidade)**

Demonstra a habilidade do teste de identificar inequivocamente o analito de interesse na presença de componentes que podem estar presentes na amostra<sup>268</sup>. No presente estudo, a seletividade foi definida como a capacidade de quantificar os

anticorpos neutralizantes para FA na presença de anticorpos para outros *Flavivirus* na mesma amostra.

**Testes:** 5 soros com títulos de anticorpos para FA mas negativos para os 4 sorotipos de dengue (FA+/DEN-) foram diluídos (1:2) no padrão interno negativo (P1/100) e, da mesma maneira, foram diluídos em 3 soros positivos (anticorpos neutralizantes) para os 4 sorotipos de dengue (DEN+) e negativos para FA. As 4 misturas de cada um dos 5 soros FA+/DEN- foram processadas em triplicata<sup>268</sup>.

**Análises:** os TMGs obtidos dos 5 soros FA+/DEN- diluídos no padrão interno negativo (P1/100) foram tomados como referência para a comparação com os TMGs obtidos dos mesmos 5 soros (FA+/DEN-) diluídos nos 3 soros DEN+. As respectivas diferenças absolutas, a partir da transformação dos títulos em  $\text{Log}_{10}$ , não deveriam ser maiores que 0,477 (ou 3 vezes.  $\text{Log}_{10} 3 = 0,477$ ) em, no mínimo, 12 (80%) das 15 amostras (misturas FA+/DEN- com DEN+) testadas<sup>268</sup>.

**Soros:**

FA+/DEN-: SIH179, SIH261, SIH282, SIH285, SIH289.

Amostras diluidoras: P1/100, SIH117 (DEN+), SIH183 (DEN+), SIH208 (DEN+).

### **3.6.4 Robustez**

Indica a capacidade do processo analítico permanecer inalterado por variações pequenas, mas deliberadas nos parâmetros do método, sugerindo confiabilidade durante a sua execução de rotina. Isto é, avalia se as variações comuns durante a execução do protocolo interferem nos resultados gerados<sup>293</sup>.

**Testes micro PRNT:** 6 soros com títulos de anticorpos para FA foram selecionados para a avaliação das seguintes variáveis (quadro 3.3): concentração viral (desvios: metade e o dobro da diluição viral ideal); tempo de neutralização (desvios:  $\pm 15$  minutos do tempo estabelecido); densidade celular (desvios: metade e o dobro da definida); tempo de adsorção (desvios:  $\pm 30$  minutos do tempo determinado).

**Quadro 3.3:** Variáveis avaliadas nos ensaios de robustez para a validação dos testes em placas de 96 poços para FA.

VARIÁVEL	CONDIÇÃO	Micro PRNT	μPRN-HRP
concentração viral	Padrão	diluição viral 1:5000	diluição viral 1:18000
	Desvio 1	diluição viral 1:2500	diluição viral 1:36000
	Desvio 2	diluição viral 1:10000	diluição viral 1:9000
tempo neutralização	Padrão	1 hora	2 horas
	Desvio 1	45 minutos	2 horas 20 minutos
	Desvio 2	1 hora 15 minutos	1 hora 40 minutos
densidade celular	Padrão	1,6 x 10 <sup>6</sup> células/mL	2,0 x 10 <sup>5</sup> células/mL
	Desvio 1	8,0 x 10 <sup>5</sup> células/mL	4,0 x 10 <sup>5</sup> células/mL
	Desvio 2	3,2 x 10 <sup>6</sup> células/mL	1,0 x 10 <sup>5</sup> células/mL
tempo adsorção	Padrão	3 horas	1 hora
	Desvio 1	2 horas 30 minutos	1 hora 15 minutos
	Desvio 2	3 horas 30 minutos	45 minutos
diluição anticorpo conjugado	Padrão	NA	1:3000
	Desvio 1	NA	1:6000
	Desvio 2	NA	1:1500
tempo anticorpo conjugado	Padrão	NA	2 horas
	Desvio 1	NA	2 horas 20 minutos
	Desvio 2	NA	1 hora 40 minutos

NA = não se aplica.

**Testes μPRN-HRP:** 6 soros com títulos de anticorpos para FA foram selecionados para a avaliação das seguintes variáveis (quadro 3.3): concentração viral (desvios: metade e o dobro da diluição viral ideal); tempo de neutralização (desvios: ± 20 minutos do tempo estabelecido); densidade celular (desvios: metade e o dobro da definida); tempo de adsorção (desvios: ± 15 minutos do tempo determinado); diluição do anticorpo conjugado (desvios: metade e o dobro da diluição ideal predefinida); tempo de incubação do anticorpo conjugado (desvios: ± 20 minutos do tempo preconizado).

**Análises:** os títulos de anticorpos neutralizantes obtidos nas condições padrões foram comparados aos títulos obtidos nas suas respectivas condições de desvio para cada variável avaliada. A robustez foi determinada se, pelo menos, 80% das amostras processadas (5 de 6) apresentaram diferença absoluta entre os títulos (padrão e desvio) menor que 0,477 (ou 3 vezes.  $\text{Log}_{10} 3 = 0,477$ ), para a comparação dos títulos transformados em  $\text{Log}_{10}^{268}$ .

**Soros:**

SIH207, SIH014, SIH145, SIH252, SIH199, SIH146.

### **3.7 Avaliação Comparativa**

Qualquer nova abordagem metodológica para a quantificação de anticorpos neutralizantes, mesmo que validada de acordo com as normas de agência reguladora, deve ser validada frente ao PRNT padrão (placas de 6 poços), de maneira comparativa, para a determinação da relação e concordância entre as metodologias<sup>227</sup>.

Foram selecionados 200 soros do estudo “Duração da Imunidade Após Duas ou Mais Doses de Vacina Contra Febre Amarela em Adultos” para a análise de concordância entre os testes de neutralização. Títulos, em  $\text{Log}_{10}$  da recíproca da diluição e em mUI/mL, obtidos dos testes índices (micro PRNT e  $\mu\text{PRN-HRP}$ ) foram comparados aos títulos obtidos dos mesmos soros no teste referência (PRNT), a partir das determinações do CCI e do Coeficiente de Correlação de Pearson e da análise dos gráficos de dispersão e Bland-Altman.

### **3.8 Análises Estatísticas**

Para as determinações dos títulos de anticorpos neutralizantes (em recíproca da diluição e mUI/mL) e suas respectivas transformações em  $\text{Log}_{10}$ , coeficientes de variação, médias de replicatas, variações e diferenças absolutas dos TMGs utilizou-se o Microsoft Excel 2016.

Para as determinações dos coeficientes de concordância (CCI e  $r$ ), estatística descritiva (média, mediana, desvio padrão e variância) e gráficos de dispersão, Bland-Altman e Box-Plot utilizou-se o programa estatístico SPSS (Statistical Package for Social Science V.17.0).

## 4 RESULTADOS

A apresentação dos dados foi dividida em 4 partes. Após a exposição dos títulos obtidos dos bancos produzidos da cepa 17D-213/77 (seção 4.1), todos os resultados gerados pelo micro PRNT em relação a sua otimização (seções 4.2.1 e 4.2.2) e validação (seção 4.2.3) serão apresentados, seguidos dos dados do  $\mu$ PRN-HRP (padronização – seção 4.3.1; calibração dos soros padrões – seção 4.3.2; validação – seção 4.3.3). Finalmente, serão apresentados os dados gerados das análises de concordância dos testes índices com o teste referência (seção 4.4).

### 4.1 Titulação Viral

A titulação por ensaio de placas de quatro alíquotas do banco máster do vírus 17D-213/77 revelou título (médio) de  $10^{7,7}$  PFU/mL.

A titulação de alíquotas do banco de trabalho mostrou título bastante satisfatório:  $10^{8,4}$  PFU/mL (média das quatro alíquotas). Os títulos obtidos de cada alíquota avaliada sugeriram variação frasco a frasco baixa ou inexistente, com resultados muito similares: três alíquotas com título de  $10^{8,4}$  PFU/mL e uma alíquota com título de  $10^{8,3}$  PFU/mL.

### 4.2 micro PRNT – placa 96 poços

#### ***4.2.1 Determinação da Faixa de Placas de Lise por Poço no Controle Viral***

Inicialmente, foram realizados ensaios simulando o micro PRNT, onde somente o vírus foi submetido à diluição seriada de fator 2, na própria microplaca, para a determinação da diluição viral ideal. O quadro 4.1 apresenta as diluições virais correspondentes à obtenção de 30 placas de lise/poço, a partir do processamento de duas alíquotas do banco de trabalho em cada ensaio.

**Quadro 4.1:** Diluições (na microplaca) do vírus 17D-213/77 correspondentes a, aproximadamente, 30 PFU/poço.

Ensaio	Diluição viral (~30 PFU/poço)
1	1:1280
2	1:5120
3	>1:5120

Apesar de ambas as alíquotas avaliadas no mesmo ensaio terem apresentado os mesmos resultados, não foi possível determinar a diluição viral ideal que resultava em, aproximadamente, 30 placas de lise por poço, devido à variabilidade observada entre os ensaios.

O quadro 4.2 apresenta as diluições virais para a obtenção de 30 placas de lise por poço em ensaios de micro PRNT, mas, neste momento, o vírus foi diluído previamente em tubos e, então, adicionado aos poços das microplacas.

Os resultados (diluições) entre os ensaios foram menos variáveis, mas inconsistentes com os observados anteriormente (quadro 4.1).

**Quadro 4.2:** Diluições (em tubos) do vírus 17D-213/77 correspondentes a, aproximadamente, 30 PFU/poço.

Ensaio	Diluição viral (~30 PFU/poço)
1	1:1250
2	1:1250
3	1:2500

A variabilidade entre esses ensaios já era observada na realização do micro PRNT na rotina do Laboratório, em que a mesma diluição viral era realizada para todos os ensaios, mas quantidades diferentes de 30 placas de lise por poço eram obtidas. A determinação da faixa de aceitação para a quantidade (mínima e máxima) de placas de lise por poço nos controles virais deve ser utilizado como critério de aceitação do teste.

A análise visual da contagem das placas de lise como único parâmetro para essa determinação não nos daria a dimensão do impacto de diferentes quantidades

de vírus no título de anticorpos de um mesmo soro. Por isso, a relação entre PFU/poço e o título de anticorpos neutralizantes também foi analisada.

O tempo de incubação para a etapa de neutralização também pode interferir na quantidade de placas de lise. Portanto, essa variável foi incluída na determinação da faixa viral aceita para os ensaios de micro PRNT.

Quatro ensaios de micro PRNT foram realizados utilizando soros com diferentes níveis de anticorpos neutralizantes, testando diferentes diluições virais (realizadas em tubos) e tempos de neutralização. A análise dos dados desses ensaios foi dividida em duas etapas: 1ª) avaliar, para cada diluição viral testada, a quantidade média obtida de placas de lise por poço e a dispersão das replicatas do controle de vírus, para determinar a diluição viral ideal; 2ª) avaliar os títulos de anticorpos neutralizantes presentes em um mesmo soro quando confrontados com diferentes concentrações de vírus, para determinar a faixa de placas de lise para o controle viral.

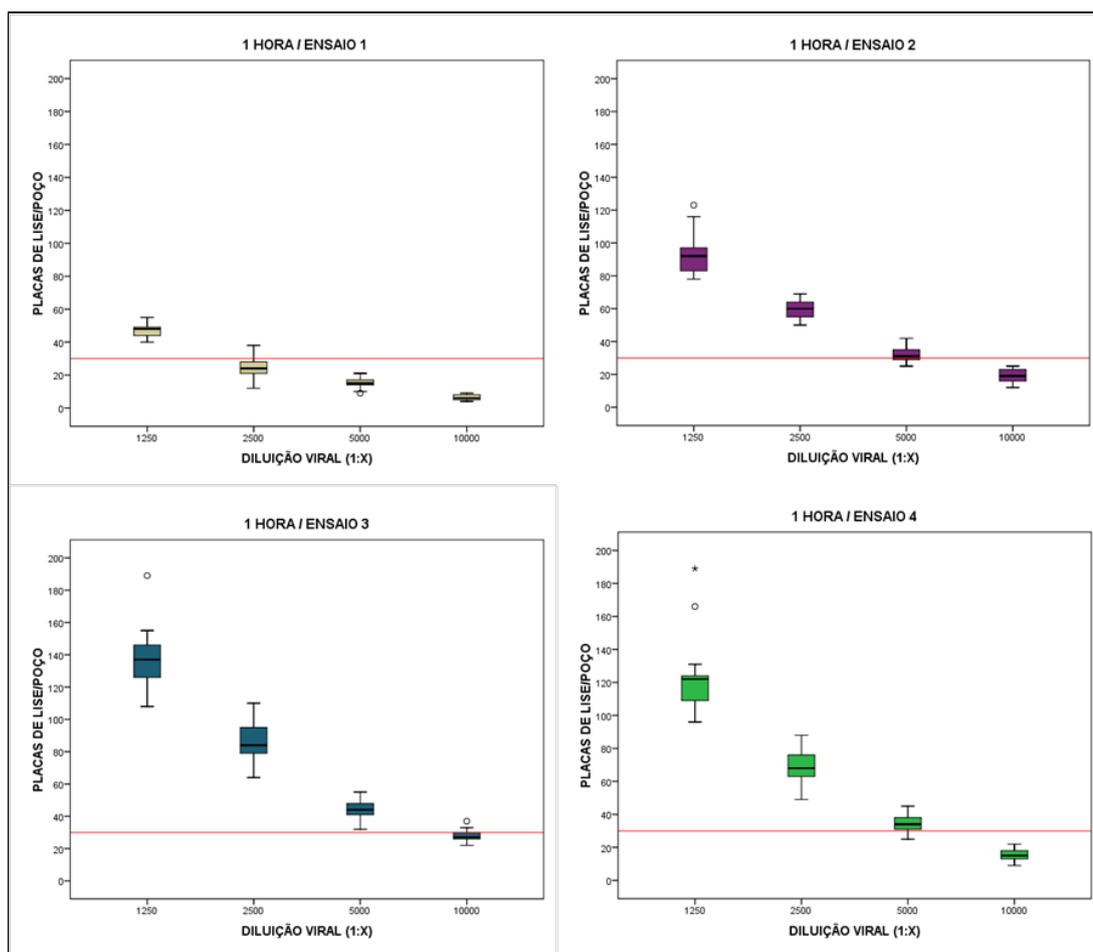
### 1ª ETAPA DE ANÁLISE

Os dados gerados a partir da incubação por 1 hora na etapa de neutralização mostraram que as diluições virais ideais para cada ensaio seriam: 1:1250 no ensaio 1 e 1:5000 nos ensaios 2, 3 e 4 (quadro 4.3 e figura 4.1).

Essas diluições resultaram em quantidades ótimas de placas de lise por poço (aproximadamente 30) e com baixa dispersão entre as replicatas referentes aos controles virais (CV em torno dos 13%).

**Quadro 4.3:** Quantidades médias de PFU/poço dos controles virais e seus respectivos coeficientes de variação (CV) de diferentes diluições do vírus 17D-213/77 em ensaios de micro PRNT com 1 hora de neutralização.

Diluições do vírus	1:1250		1:2500		1:5000		1:10000	
	PFU/poço (média)	CV (%)						
Ensaio 1	46,9	9,24	24,1	24,05	15,0	18,85	6,3	23,6
Ensaio 2	93,3	13,55	59,4	9,66	31,4	13,63	18,8	22,09
Ensaio 3	137,7	12,73	87,0	13,26	44,8	12,75	27,4	14,38
Ensaio 4	122,2	17,05	68,5	15,42	34,5	16,17	15,7	23,74

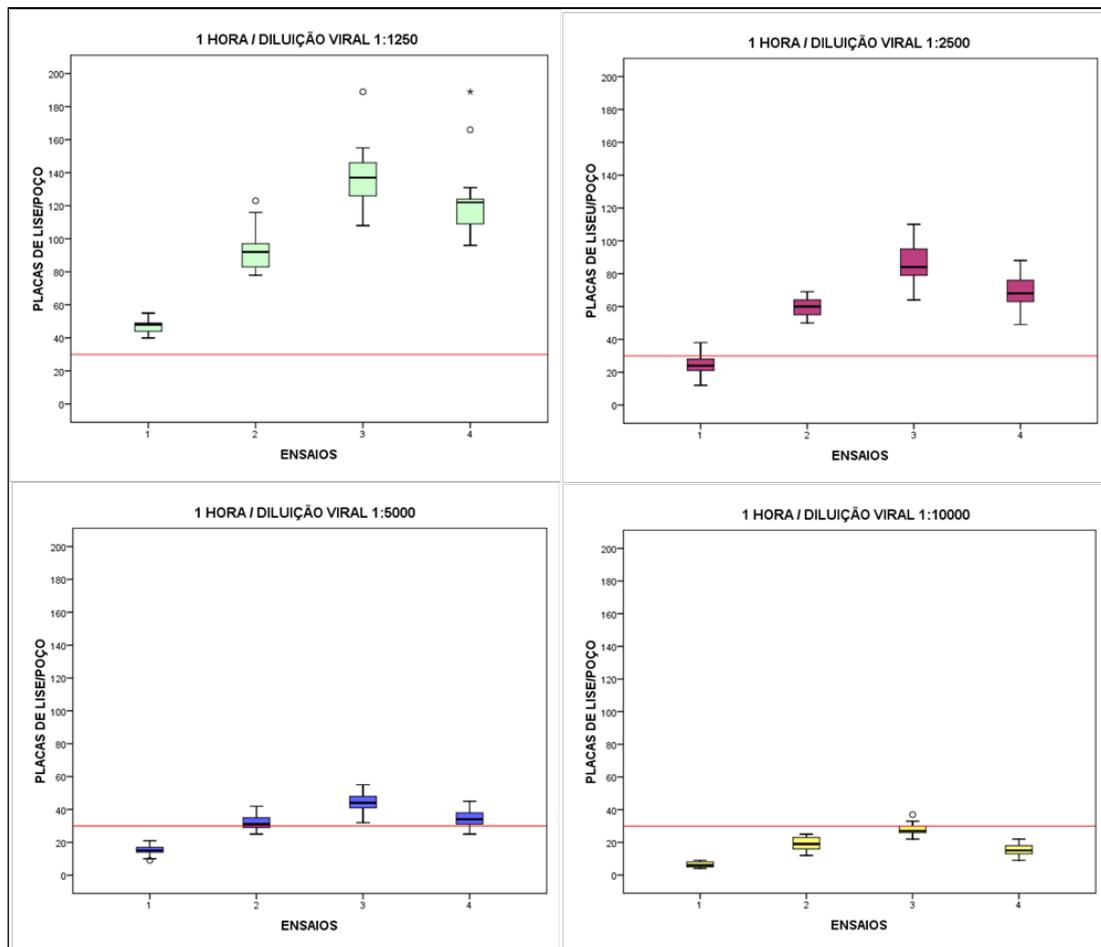


**Figura 4.1: Gráficos de Boxplot das diluições virais avaliadas em diferentes ensaios de micro PRNT com 1 hora de neutralização.**

Ensaio 1 - gráfico superior à esquerda. Ensaio 2 - gráfico superior à direita. Ensaio 3 - gráfico inferior à esquerda. Ensaio 4 - gráfico inferior à direita. Eixo X: diluições do vírus 17D-213/77 (1:1250; 1:2500; 1:5000; 1:10000). Eixo Y: placas de lise por poço contadas nas replicatas dos controles virais. Linha vermelha na posição 30 placas de lise/poço. SPSS V.17.0.

A análise individual de cada diluição viral nos diferentes ensaios (figura 4.2) indicou a menor variabilidade entre os ensaios para as quantidades de placas de lise por poço obtidas da diluição 1:5000 do vírus.

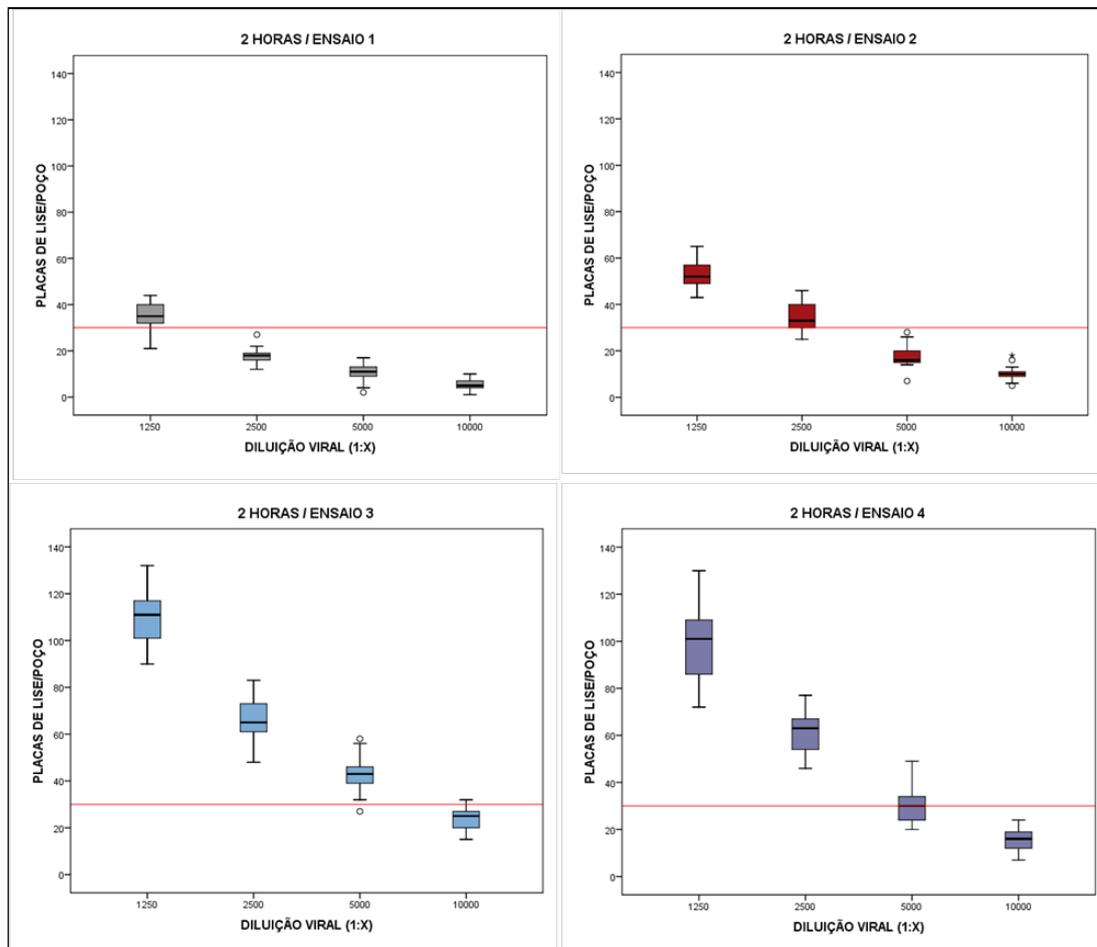
As análises dos dados obtidos da neutralização por 2 horas sugeriram que as diluições virais ideais de cada ensaio seriam: 1:1250 no ensaio 1, 1:2500 no ensaio 2 e 1:5000 nos ensaios 3 e 4 (quadro 4.4 e figura 4.3). Essas diluições resultaram em quantidades ótimas de placas de lise por poço (próxima de 30), possibilitando contagem clara, de fácil individualização das placas de lise e com dispersão aceitável entre as replicatas referentes aos controles virais (CV em torno dos 20%).



**Figura 4.2:** Gráficos de Boxplot dos ensaios de micro PRNT com 1 hora de neutralização para as diferentes diluições avaliadas do vírus 17D-213/77. Diluição viral 1:1250 - gráfico superior à esquerda. Diluição viral 1:2500 - gráfico superior à direita. Diluição viral 1:5000 - gráfico inferior à esquerda. Diluição viral 1:10000 - gráfico inferior à direita. Eixo X: ensaios independentes de micro PRNT (1, 2, 3 e 4). Eixo Y: placas de lise por poço contadas nas replicatas dos controles virais. Linha vermelha na posição 30 placas de lise/poço. SPSS V.17.0.

**Quadro 4.4:** Quantidades médias de PFU/poço dos controles virais e seus respectivos coeficientes de variação (CV) de diferentes diluições do vírus 17D-213/77 em ensaios de micro PRNT com 2 horas de neutralização.

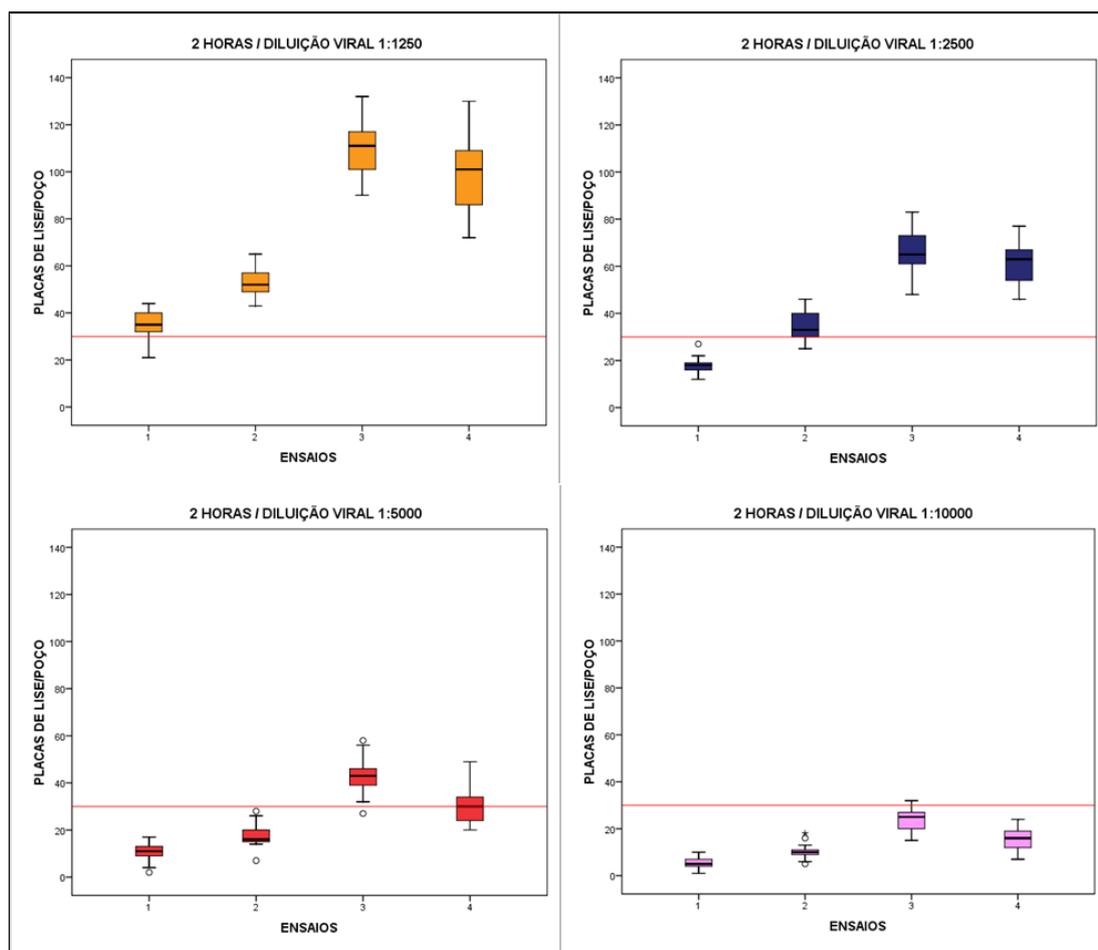
Diluições do vírus	1:1250		1:2500		1:5000		1:10000	
	PFU/poço (média)	CV (%)						
Ensaio 1	35,1	17,84	17,9	18,34	10,6	33,49	5,2	50,11
Ensaio 2	53,0	10,67	34,7	17,63	17,7	26,00	10,3	30,04
Ensaio 3	109,3	9,64	65,8	14,48	42,7	17,82	24,0	18,01
Ensaio 4	99,9	16,53	61,4	14,79	30,0	22,9	15,9	29,95



**Figura 4.3: Gráficos de Boxplot das diluições virais avaliadas em diferentes ensaios de micro PRNT com 2 horas de neutralização.**

Ensaio 1 - gráfico superior à esquerda. Ensaio 2 - gráfico superior à direita. Ensaio 3 - gráfico inferior à esquerda. Ensaio 4 - gráfico inferior à direita. Eixo X: diluições do vírus 17D-213/77 (1:1250; 1:2500; 1:5000; 1:10000). Eixo Y: placas de lise por poço contadas nas replicatas dos controles virais. Linha vermelha na posição 30 placas de lise/poço. SPSS V.17.0.

A análise de cada diluição nos diferentes ensaios (figura 4.4) apontou a alta variabilidade das quantidades de PFU/poço obtidas nos controles virais para todas as diluições, especialmente quando se comparou os ensaios 1 e 2 aos ensaios 3 e 4.



**Figura 4.4: Gráficos de Boxplot dos ensaios de micro PRNT com 2 horas de neutralização para as diferentes diluições avaliadas do vírus 17D-213/77.**

Diluição viral 1:1250 - gráfico superior à esquerda. Diluição viral 1:2500 - gráfico superior à direita. Diluição viral 1:5000 - gráfico inferior à esquerda. Diluição viral 1:10000 - gráfico inferior à direita. Eixo X: ensaios independentes de micro PRNT (1, 2, 3 e 4). Eixo Y: placas de lise por poço contadas nas replicatas dos controles virais. Linha vermelha na posição 30 placas de lise/poço. SPSS V.17.0.

## 2ª ETAPA DE ANÁLISE

Para as análises dos títulos de anticorpos obtidos a partir de diferentes concentrações de vírus, foram descartados os resultados em que a quantidade média de placas de lise por poço referente ao controle viral do ensaio foi igual ou superior a 60 (devido à dificuldade e subjetividade da contagem).

Nos ensaios submetidos a 1 hora de neutralização, a faixa viral avaliada foi de 6,3 (ensaio 1; diluição viral 1:10000) a 59,4 (ensaio 2; diluição viral 1:2500) PFU/poço. No quadro abaixo (4.5), os TMGs obtidos da duplicata de soros com diferentes diluições do vírus. As células sombreadas em cinza correspondem aos dados não analisados (mais de 60 PFU/poço).

As médias obtidas dos TMGs ficaram dentro do esperado para seus respectivos soros com diferentes concentrações de anticorpos neutralizantes: 1:362 (M7/10), 1:163 (M7/30) e 1:78 (M7/50); 1:19 para o controle negativo (comercial SIGMA) e 1:263 para o controle positivo (referência internacional NIBSC).

Considerando a relação entre títulos de anticorpos e a concentração viral (representada pela quantidade média de placas de lise por poço obtida de cada diluição do vírus), a determinação da faixa de aceitação viral para cada soro foi de acordo com os resultados observados dentro da diferença de três vezes da média de títulos.

Portanto, M7/10 e M7/50 apresentaram títulos dentro do critério de variação quando submetidos à diluição viral que resulte entre 15 e 59 PFU/poço. Com resultados mais variáveis, M7/30 teria faixa viral definida entre 19 e 59 PFU/poço. Para os controles positivo e negativo, todos os títulos obtidos apresentaram-se dentro da variação de 3 vezes da média. Logo, poderiam ser submetidos à qualquer concentração viral.

**Quadro 4.5:** TMGs de anticorpos neutralizantes para FA de soros processados pelo micro PRNT com tempo de neutralização de 1 hora, para diferentes diluições virais da cepa 17D-213/77.

Ensaio	Diluição viral	PFU/poço (média controle viral)	TMGs* (1:X)				
			M7/10**	M7/30**	M7/50**	C-***	C+****
1	1:1250	46,9	359	199	59	13	195
	1:2500	24,1	282	145	69	21	180
	1:5000	15,0	230	31*	56	13	276
	1:10000	6,3	65*	70	22*	11	231
2	1:1250	93,3	433	116	55	14	203
	1:2500	59,4	293	85	56	18	212
	1:5000	31,4	207	208	65	21	241
	1:10000	18,8	482	76	136	32	306
3	1:1250	137,7	640	292	107	21	378
	1:2500	87,0	640	322	116	23	440
	1:5000	44,8	566	397	87	21	560
	1:10000	27,4	640	317	121	26	327
4	1:1250	122,2	473	187	65	21	187
	1:2500	68,5	448	114	68	25	236
	1:5000	34,5	388	217	97	17	215
	1:10000	15,7	473	45*	93	21	150
<b>Médias***** (± 3X)</b>			362 (121 - 1087)	163 (54 - 488)	78 (26 - 235)	19 (6 - 58)	263 (88 - 789)

\* TMGs (títulos médios geométricos) em recíproca da diluição (1:X) obtidos a partir de duplicatas do soro.

\*\* soro M7 (alto título de anticorpos neutralizantes para FA) diluído 10 (M7/10), 30 (M7/30) ou 50 (M7/50) vezes em soro comercial negativo (SIGMA).

\*\*\* C- = controle negativo do teste (soro comercial negativo SIGMA).

\*\*\*\* C+ = controle positivo do teste (soro referência internacional NIBSC) diluído 10 vezes em soro comercial negativo (SIGMA).

\*\*\*\*\* Médias determinadas considerando somente os títulos obtidos a partir da faixa viral avaliada (títulos sombreados não foram incluídos).

\* resultados fora do critério de ± 3 vezes a média dos TMGs de cada soro.

Nos ensaios submetidos a 2 horas de neutralização, a faixa viral avaliada foi de 5,2 (ensaio 1; diluição viral 1:10000) a 53 (ensaio 2; diluição viral 1:1250) PFU/poço. No quadro abaixo (4.6), os TMGs obtidos da duplicata de soros com diferentes diluições do vírus. As células sombreadas em cinza correspondem aos dados não analisados (mais de 60 PFU/poço).

As médias obtidas dos TMGs ficaram dentro do esperado para seus respectivos soros com diferentes concentrações de anticorpos neutralizantes: 1:472 (M7/10), 1:192 (M7/30) e 1:119 (M7/50); 1:25 para o controle negativo e 1:335 para o controle positivo.

Considerando a relação entre os títulos de anticorpos e a concentração viral, somente 1 resultado foi retirado para a determinação da faixa de aceitação viral para cada soro por ter apresentado título acima da diferença de três vezes da média de títulos.

Assim, M7/50 apresentou títulos dentro da variação de três vezes da média quando submetidos à diluição viral que resulte entre 5 e 35 PFU/poço. Para os demais soros avaliados (M7/10, M7/30 e os controles positivo e negativo), todos os títulos obtidos apresentaram-se dentro da variação de 3 vezes da média e, portanto, a quantidade média de placas de lise no controle de vírus poderia variar entre 5 e 53.

A análise comparativa dos dados dessas duas etapas de análise (quadro 4.7) possibilitou determinar a diluição ideal do vírus 17D-213/77 e a faixa de aceitação para a quantidade de placas de lise obtidas por poço, além do melhor tempo de neutralização. O resultado dessa análise foi a delimitação das quantidades médias mínima e máxima de PFU/poço para os controles virais, significando um critério de inclusão/exclusão para os ensaios de micro PRNT.

A partir dos resultados gerados dos 4 ensaios de micro PRNT, observou-se que com 1 hora de neutralização há menor variação entre os ensaios na determinação da diluição viral ideal, com CVs mais baixos das replicatas dos controles de vírus, quando comparados aos resultados de 2 horas. Além disso, todos os TMGs de anticorpos obtidos das diluições virais ideais escolhidas para cada ensaio de 1 hora mostraram-se dentro da variação de até 3 vezes o valor da média.

Considerando os intervalos mais restritos para a quantidade média de PFU/poço determinados de acordo com os TMGs obtidos para os diferentes soros, realizar o teste com 1 hora de neutralização possibilita aceitar uma faixa viral mais ampla (19 a 59 PFU/poço) do que os ensaios realizados com 2 horas (5 a 35

PFU/poço). Esse dado é importante diante da conhecida variabilidade observada entre os controles virais dos ensaios de rotina, ainda que sempre utilizando a mesma diluição viral e a maneira padronizada de realizar essa diluição nos diferentes ensaios.

**Quadro 4.6:** TMGs de anticorpos neutralizantes para FA de soros processados pelo micro PRNT com tempo de neutralização de 2 horas, para diferentes diluições virais da cepa 17D-213/77.

Ensaio	Diluição viral	PFU/poço (média controle viral)	TMGs* (1:X)				
			M7/10**	M7/30**	M7/50**	C-***	C+****
1	1:1250	35,1	378	83	55	14	295
	1:2500	17,9	548	97	88	8	219
	1:5000	10,6	444	108	81	17	274
	1:10000	5,2	197	83	46	22	191
2	1:1250	53,0	498	92	45	25	174
	1:2500	34,7	640	129	42	20	415
	1:5000	17,7	419	176	73	19	218
	1:10000	10,3	409	364	118	9	261
3	1:1250	109,3	640	352	144	30	432
	1:2500	65,8	622	498	130	36	477
	1:5000	42,7	640	475	362*	48	632
	1:10000	24,0	405	311	278	51	625
4	1:1250	99,9	502	142	163	25	300
	1:2500	61,4	595	219	252	34	456
	1:5000	30,0	441	315	84	30	489
	1:10000	15,9	639	75	154	34	231
<b>Médias***** (± 3X)</b>			472 (157 - 1415)	192 (64 - 577)	119 (40 - 357)	25 (8 - 74)	335 (112 - 1006)

\* TMGs (títulos médios geométricos) em recíproca da diluição (1:X) obtidos a partir de duplicatas do soro.

\*\* soro M7 (alto título de anticorpos neutralizantes para FA) diluído 10 (M7/10), 30 (M7/30) ou 50 (M7/50) vezes em soro comercial negativo (SIGMA).

\*\*\* C- = controle negativo do teste (soro comercial negativo SIGMA).

\*\*\*\* C+ = controle positivo do teste (soro referência internacional NIBSC) diluído 10 vezes em soro comercial negativo (SIGMA).

\*\*\*\*\* Médias determinadas considerando somente os títulos obtidos a partir da faixa viral avaliada (títulos sombreados não foram incluídos).

\* resultados fora do critério de ± 3 vezes a média dos TMGs de cada soro.

Observou-se também que as diluições virais escolhidas para cada ensaio de 1 hora (1ª etapa da análise) resultaram em quantidades médias de PFU/poço dentro das faixas virais ideais determinadas na 2ª etapa de análise.

Finalmente, a realização do teste com 1 hora de neutralização significa reduzir o tempo de execução do micro PRNT, que leva, em média, 6 horas desde a etapa de diluição dos soros até a adição do meio semissólido.

Assim, para os ensaios seguintes deste trabalho (seções 4.2.2, 4.2.3 e 4.4) foram aceitos somente os resultados de micro PRNT que apresentaram entre 19 a 59 PFU/poço (média das replicatas do controle de vírus), resultantes da diluição 1:5000

da cepa 17D-213/77 e submetidos a 1 hora de incubação para a etapa de neutralização.

**Quadro 4.7:** Análise comparativa de ensaios de micro PRNT com 1 ou 2 horas de neutralização de soros com diferentes níveis de anticorpos neutralizantes para FA, submetidos a diferentes diluições do vírus 17D-213/77.

		TEMPO NEUTRALIZAÇÃO	
		1 HORA	2 HORAS
DILUIÇÃO VIRAL* – PFU/POÇO** – CV*** (%)	ENSAIO 1	1:1250 – 46,9 – 9,24%	1:1250 – 35,1 – 17,84%
	ENSAIO 2	1:5000 – 31,4 – 13,63%	1:2500 – 34,7 – 17,63%
	ENSAIO 3	1:5000 – 44,8 – 12,75%	1:5000 – 42,7 – 17,82%
	ENSAIO 4	1:5000 – 34,5 – 16,17%	1:5000 – 30,0 – 22,90%
FAIXA DE ACEITAÇÃO CONTROLE DE VÍRUS****	M7/10	15 – 59	5 – 53
	M7/30	19 – 59	5 – 53
	M7/50	15 – 59	5 – 35
	C-	6 – 59	5 – 53
	C+	6 – 59	5 – 53

\* diluição viral escolhida para cada ensaio de acordo com a quantidade de placas de lise obtida e a variação das replicatas dos controles de vírus.

\*\* quantidade média de PFU/poço obtida no controle de vírus a partir da respectiva diluição viral.

\*\*\* CV = coeficiente de variação obtido das replicatas dos controles virais.

\*\*\*\* quantidade média (mínima – máxima) de PFU/poço obtida no controle de vírus determinada de acordo com os títulos de anticorpos neutralizantes para FA de cada soro.

C- = controle negativo do teste (soro comercial negativo SIGMA).

C+ = controle positivo do teste (soro referência internacional NIBSC) diluído 10 vezes em soro comercial negativo (SIGMA).

#### 4.2.2 Calibração dos Soros Padrões

O TMG dos 30 resultados do soro P3 resultou em 10.264 mUI/mL. Este valor foi utilizado para a transformação, em mUI/mL, dos títulos obtidos no micro PRNT de soros processados neste estudo.

O TMG em recíproca da diluição dos 30 resultados do soro P3 foi de 191. Considerando a variação de 3 vezes, títulos entre 64 e 572 seriam aceitos para o soro padrão positivo nos ensaios de micro PRNT.

Para o soro padrão negativo P1/100, o TMG dos 30 resultados, em recíproca da diluição, foi de 2,5, podendo variar até 7,5.

### **4.2.3 Validação do Teste**

#### **Precisão (ou confiabilidade)**

Soros com diferentes níveis de anticorpos neutralizantes foram processados, por dois operadores, em 3 ensaios independentes do micro PRNT de FA. Os TMGs e as suas respectivas variações de até 3 vezes ( $\pm 0,48$ .  $\text{Log}_{10} 3 = 0,477$ ) foram determinados para a avaliação da precisão intraensaio (quadro 4.8).

Os resultados mostraram que, nos três ensaios, o critério preestabelecido foi atingido: pelo menos 5 (90%) dos 6 títulos obtidos do soro não deveriam variar mais que 3 vezes o valor de seu TMG para, no mínimo, 13 (80%) dos 16 soros avaliados.

No ensaio 1, três soros apresentaram uma replicata com título de anticorpos extrapolando a variação, o que era aceitável. No ensaio 2, todas as replicatas dos 16 soros apresentaram títulos dentro da variação do TMG. No ensaio 3, um soro apresentou duas replicatas com títulos fora da variação de 3 vezes. No entanto, este ensaio foi válido, pois os outros 15 soros (94%) atingiram o critério de variação preestabelecido.

A precisão interensaio foi avaliada de duas maneiras: considerando os 12 resultados dos 16 soros processados pelo mesmo operador, em dois ensaios independentes (quadro 4.9); considerando os 18 resultados obtidos para cada um dos 16 soros, resultantes de 3 ensaios, variando o operador (quadro 4.10).

As análises dos dados de precisão interensaio também apresentaram resultados satisfatórios. Todos os soros atingiram o critério preestabelecido de que, pelo menos, 90% dos resultados obtidos para um soro (11 de 12 ou 16 de 18) deveriam estar dentro da faixa de variação ( $\pm 0,48$ ) do TMG.

**Quadro 4.8:** Dados de avaliação da precisão intraensaio do micro PRNT de FA.

SORO	ENSAIO 1 (OPERADOR 1)			ENSAIO 2 (OPERADOR 1)			ENSAIO 3 (OPERADOR 2)		
	TMG ( $\pm 0,48$ ) <sup>*</sup>	títulos fora da variação	CV (%)	TMG ( $\pm 0,48$ ) <sup>*</sup>	títulos fora da variação	CV (%)	TMG ( $\pm 0,48$ ) <sup>*</sup>	títulos fora da variação	CV (%)
SIH202	2,44 (1,96; 2,92)	1	12	2,27 (1,79; 2,75)	0	5	2,53 (2,05; 3,01)	0	6
SIH228	2,09 (1,61; 2,57)	0	7	2,27 (1,79; 2,75)	0	3	2,34 (1,86; 2,82)	0	6
SIH017	2,69 (2,21; 3,17)	0	4	2,70 (2,22; 3,18)	0	5	2,36 (1,88; 2,84)	2	20 <sup>*</sup>
SIH271	2,80 (2,32; 3,28)	0	1	2,63 (2,15; 3,11)	0	6	2,12 (1,64; 2,60)	0	7
SIH250	2,02 (1,54; 2,50)	0	9	2,10 (1,62; 2,58)	0	4	2,04 (1,56; 2,52)	0	8
SIH008	2,15 (1,67; 2,63)	1	14	2,02 (1,54; 2,50)	0	5	2,00 (1,52; 2,48)	0	8
SIH269	2,31 (1,83; 2,79)	0	9	2,28 (1,80; 2,76)	0	6	2,18 (1,70; 2,66)	0	4
SIH071	1,81 (1,33; 2,29)	0	4	1,89 (1,41; 2,37)	0	11	1,76 (1,28; 2,24)	0	7
SIH172	2,21 (1,73; 2,69)	0	10	2,49 (2,01; 2,97)	0	8	2,23 (1,75; 2,71)	0	4
SIH068	2,40 (1,92; 2,88)	0	13	2,35 (1,87; 2,83)	0	5	2,08 (1,60; 2,56)	0	6
SIH256	1,62 (1,14; 2,10)	0	17 <sup>*</sup>	1,45 (0,97; 1,93)	0	8	1,37 (0,89; 1,85)	0	12
SIH129	1,72 (1,24; 2,20)	0	5	1,66 (1,18; 2,14)	0	7	1,70 (1,22; 2,18)	0	6
SIH232	2,07 (1,59; 2,55)	1	18 <sup>*</sup>	2,02 (1,54; 2,50)	0	3	2,01 (1,53; 2,49)	0	9
SIH139	1,84 (1,36; 2,32)	0	10	1,84 (1,36; 2,32)	0	4	2,03 (1,55; 2,51)	0	8
SIH144	1,59 (1,11; 2,07)	0	4	1,59 (1,11; 2,07)	0	16 <sup>*</sup>	1,61 (1,13; 2,09)	0	12
SIH268	1,95 (1,47; 2,43)	0	5	2,03 (1,55; 2,51)	0	6	1,98 (1,50; 2,46)	0	9

\* TMG ( $\text{Log}_{10}$  da recíproca da diluição) calculado a partir dos títulos obtidos das 6 replicatas do soro no mesmo ensaio.  $\text{Log}_{10} 3 = 0,48$ .

\* valor de CV acima de 15%.

**Quadro 4.9:** Dados de avaliação da precisão interensaio do micro PRNT de FA: mesmo operador, ensaios diferentes.

SORO	ENSAIOS 1 e 2 (OPERADOR 1)		
	TMG ( $\pm 0,48$ ) <sup>*</sup>	títulos fora da variação	CV (%)
SIH202	2,35 (1,87; 2,83)	0	10
SIH228	2,18 (1,70; 2,66)	0	6
SIH017	2,70 (2,22; 3,18)	0	5
SIH271	2,71 (2,23; 3,19)	0	5
SIH250	2,06 (1,58; 2,54)	0	7
SIH008	2,08 (1,60; 2,56)	1	11
SIH269	2,29 (1,81; 2,77)	0	7
SIH071	1,85 (1,37; 2,33)	0	8
SIH172	2,34 (1,86; 2,82)	0	10
SIH068	2,38 (1,90; 2,86)	0	9
SIH256	1,53 (1,05; 2,01)	0	14
SIH129	1,69 (1,21; 2,17)	0	6
SIH232	2,04 (1,56; 2,52)	1	12
SIH139	1,84 (1,36; 2,32)	0	7
SIH144	1,59 (1,11; 2,07)	0	11
SIH268	1,99 (1,51; 2,47)	0	6

\* TMG ( $\text{Log}_{10}$  da recíproca da diluição) calculado a partir dos 12 títulos obtidos do soro em 2 ensaios independentes.  $\text{Log}_{10} 3 = 0,48$ .

**Quadro 4.10:** Dados de avaliação da precisão interensaio do micro PRNT de FA: operadores diferentes, ensaios diferentes.

SORO	ENSAIOS 1, 2 e 3 (OPERADORES 1 e 2)		
	TMG ( $\pm 0,48$ ) <sup>*</sup>	títulos fora da variação	CV (%)
SIH202	2,41 (1,93; 2,89)	1	9
SIH228	2,23 (1,75; 2,71)	0	7
SIH017	2,58 (2,10; 3,06)	2	12
SIH271	2,50 (2,02; 2,98)	1	13
SIH250	2,05 (1,57; 2,53)	0	7
SIH008	2,06 (1,58; 2,54)	1	10
SIH269	2,25 (1,77; 2,73)	0	7
SIH071	1,82 (1,34; 2,30)	0	8
SIH172	2,30 (1,82; 2,78)	1	9
SIH068	2,27 (1,79; 2,75)	2	11
SIH256	1,48 (1,00; 1,96)	0	15
SIH129	1,69 (1,21; 2,17)	0	6
SIH232	2,03 (1,55; 2,51)	1	11
SIH139	1,90 (1,42; 2,38)	0	9
SIH144	1,60 (1,12; 2,08)	0	11
SIH268	1,99 (1,51; 2,47)	0	7

\* TMG ( $\text{Log}_{10}$  da recíproca da diluição) calculado a partir dos 18 títulos obtidos do soro em 3 ensaios independentes.  $\text{Log}_{10} 3 = 0,48$ .

### **Exatidão (ou capacidade de diluição)**

Os dados para a avaliação de exatidão do micro PRNT (quadro 4.11) foram obtidos a partir do processamento, no mesmo ensaio, de 4 soros positivos para FA diluídos ou não em soro negativo, gerando 14 amostras com níveis diferentes de anticorpos neutralizantes.

Todas as diferenças absolutas entre os TMGs observados e esperados determinadas para os 4 soros avaliados e suas respectivas apresentações diluídas não foram maiores que 3 vezes; atingindo, portanto, o critério preestabelecido em que, no mínimo, 11 (80%) das 14 amostras deveriam ter apresentado diferença de até 3 vezes ( $\pm 0,477$ ) entre os TMGs observado e esperado.

### **Seletividade (ou especificidade)**

A avaliação da seletividade do micro PRNT resultou do processamento, no mesmo ensaio, de soros com títulos de anticorpos neutralizantes para FA misturados a soros com anticorpos para dengue. Tomando como diluição referência a mistura dos soros positivos para FA com o soro padrão negativo (P1/100), foi determinada a diferença absoluta entre os títulos obtidos (quadro 4.12).

Os dados apontaram a alta seletividade do micro PRNT de FA. Todas as diferenças absolutas observadas entre os TMGs das misturas referência (soros FA+/DEN- com soro FA-) e os das misturas teste (soros FA+/DEN- com DEN+) foram menores que 0,477.

**Quadro 4.11:** Dados de avaliação da exatidão do micro PRNT de FA.

SORO	DILUIÇÃO*	TMG OBSERVADO** (Log <sub>10</sub> )	TMG ESPERADO*** (Log <sub>10</sub> )	DIFERENÇA ABSOLUTA****
P3	não diluído	2,627	NA	NA
	1:2	2,208	2,326	0,117
	1:4	1,977	2,025	0,048
	1:8	1,653	1,724	0,071
	1:16	1,274	1,422	0,148
	1:32	1,109	1,121	0,012
SIH020	não diluído	2,676	NA	NA
	1:4	2,209	2,074	0,134
	1:8	1,993	1,773	0,220
	1:16	1,545	1,472	0,072
SIH128	não diluído	2,483	NA	NA
	1:4	1,905	1,880	0,025
	1:8	1,469	1,579	0,111
	1:16	1,207	1,278	0,072
SIH167	não diluído	2,498	NA	NA
	1:4	1,800	1,896	0,096
	1:8	1,472	1,595	0,123
	1:16	1,158	1,294	0,136

\* diluição prévia do soro íntegro (P3, SIH020, SIH128 e SIH167) no soro padrão interno negativo (P1/100).

\*\* TMG (em recíproca da diluição) calculado a partir de 5 replicatas de cada soro.

\*\*\* TMG (em recíproca da diluição) observado para o soro não diluído subtraído pelo fator de diluição. Fatores de diluição em Log<sub>10</sub>: 2 = 0,301; 4 = 0,602; 8 = 0,903; 16 = 1,204; 32 = 1,505.

\*\*\*\* Diferença absoluta entre os TMGs observado e esperado.

NA = não se aplica.

## **Robustez**

A robustez do micro PRNT foi analisada a partir do processamento de 6 soros amostrais, submetidos a pequenos e comuns desvios de diferentes variáveis do protocolo de execução do teste. Os títulos de anticorpos obtidos das condições desvio foram comparados ao título obtido na condição padrão respectiva para a determinação da diferença absoluta entre eles (quadro 4.13).

Não houve diferença absoluta na comparação entre os títulos obtidos para as condições padrão e desvio maior que 0,477 (ou maior que 3 vezes), indicando que o micro PRNT é robusto para as variáveis avaliadas.

**Quadro 4.12:** Dados de avaliação da seletividade do micro PRNT de FA.

<b>SORO (FA+/DEN-)</b>	<b>AMOSTRA DILUIDORA*</b>	<b>TMG OBSERVADO** (Log<sub>10</sub>)</b>	<b>DIFERENÇA ABSOLUTA***</b>
<b>SIH179</b>	P1/100 (FA-)	1,961	NA
	SIH117 (DEN+)	2,160	0,200
	SIH183 (DEN+)	2,019	0,058
	SIH208 (DEN+)	1,803	0,157
<b>SIH261</b>	P1/100 (FA-)	1,919	NA
	SIH117 (DEN+)	1,879	0,040
	SIH183 (DEN+)	2,069	0,150
	SIH208 (DEN+)	2,048	0,130
<b>SIH282</b>	P1/100 (FA-)	2,314	NA
	SIH117 (DEN+)	2,214	0,101
	SIH183 (DEN+)	2,391	0,077
	SIH208 (DEN+)	1,859	0,456
<b>SIH285</b>	P1/100 (FA-)	1,719	NA
	SIH117 (DEN+)	1,929	0,210
	SIH183 (DEN+)	2,034	0,315
	SIH208 (DEN+)	2,017	0,297
<b>SIH289</b>	P1/100 (FA-)	1,860	NA
	SIH117 (DEN+)	2,003	0,142
	SIH183 (DEN+)	2,052	0,192
	SIH208 (DEN+)	2,088	0,228

\* soro padrão interno negativo para anticorpos de FA (FA-) ou soro amostral com anticorpos para 1 ou mais sorotipos do vírus da dengue (DEN+) utilizado para diluir (proporção 1:1) soro positivo para FA e negativo para dengue (FA+/DEN-).

\*\* TMG (em recíproca da diluição) calculado a partir de 3 replicatas de cada amostra (mistura de soros).

\*\*\* Diferença absoluta entre os TMGs obtidos para a mistura referência (soro FA+/DEN- com P1/100) e a mistura teste (soro FA+/DEN- com soro DEN+).

NA = não se aplica.

**Quadro 4.13:** Dados de avaliação da robustez do micro PRNT de FA.

VARIÁVEL	SORO	TÍTULO* (Log <sub>10</sub> ) CONDIÇÃO PADRÃO	TÍTULO* (Log <sub>10</sub> ) CONDIÇÃO DESVIO 1	TÍTULO* (Log <sub>10</sub> ) CONDIÇÃO DESVIO 2	DIFERENÇA ABSOLUTA DESVIO 1**	DIFERENÇA ABSOLUTA DESVIO 2**
concentração viral	SIH207	2,441	2,206	2,806	0,235	0,365
	SIH014	2,153	2,297	2,487	0,144	0,334
	SIH145	1,720	1,728	2,057	0,008	0,337
	SIH252	1,905	2,038	2,342	0,133	0,437
	SIH199	1,531	1,536	1,745	0,005	0,214
	SIH146	1,825	1,821	2,275	0,004	0,450
tempo neutralização	SIH207	2,484	2,619	2,806	0,135	0,322
	SIH014	2,336	2,392	2,415	0,056	0,079
	SIH145	1,964	1,845	2,021	0,119	0,057
	SIH252	2,108	2,146	2,186	0,038	0,077
	SIH199	1,744	2,079	1,806	0,335	0,062
	SIH146	2,016	1,865	2,396	0,150	0,380
densidade celular	SIH207	2,770	2,408	2,563	0,362	0,207
	SIH014	2,410	2,254	2,219	0,156	0,191
	SIH145	1,886	1,517	1,817	0,369	0,070
	SIH252	2,108	2,148	2,194	0,040	0,086
	SIH199	1,725	1,452	1,709	0,273	0,016
	SIH146	2,103	1,818	2,173	0,284	0,070
tempo adsorção	SIH207	2,727	2,609	2,698	0,118	0,029
	SIH014	2,228	2,140	2,409	0,088	0,182
	SIH145	1,800	1,637	1,840	0,163	0,040
	SIH252	1,970	1,822	2,189	0,148	0,219
	SIH199	2,056	1,699	1,894	0,357	0,162
	SIH146	2,028	1,879	1,899	0,149	0,129

\* título de anticorpos neutralizantes para FA em recíproca da diluição.

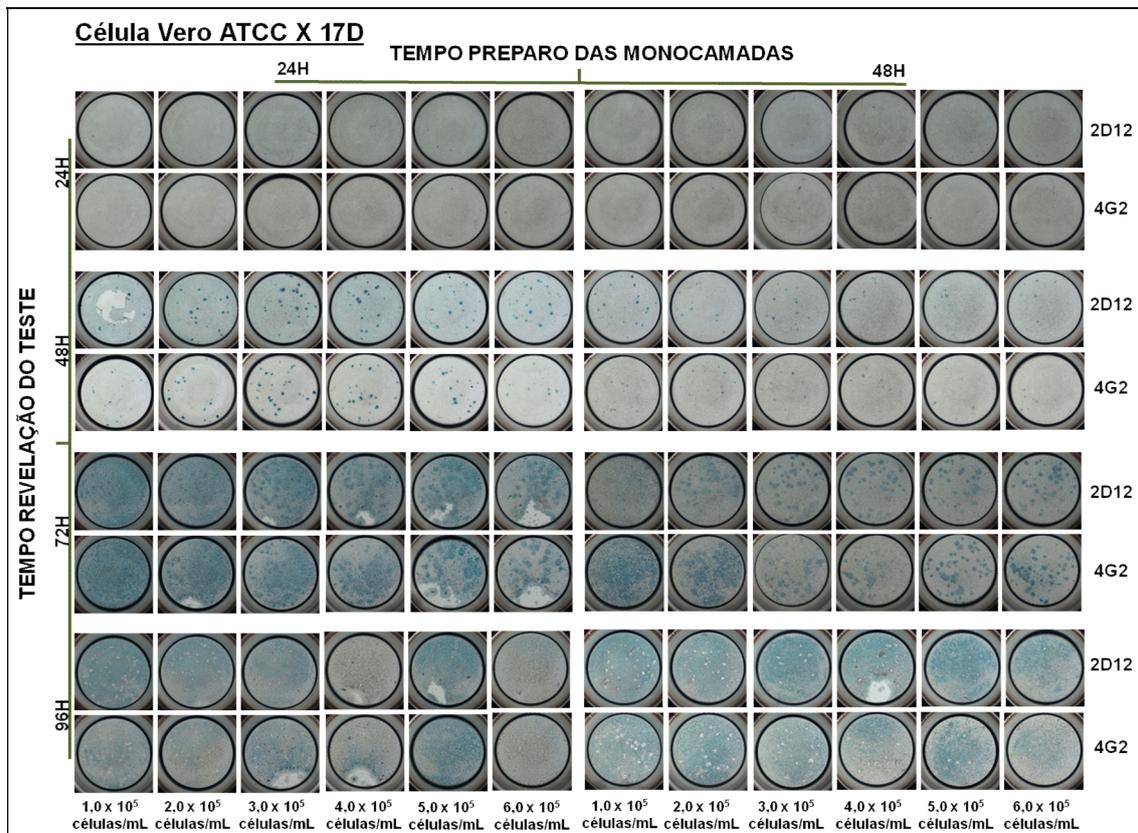
\*\* Diferença absoluta entre os títulos de anticorpos obtidos na condição padrão e na condição desvio (1 ou 2) de variável do protocolo de execução do micro PRNT.

### 4.3 μPRN-HRP – placa 96 poços

#### 4.3.1 Padronização do teste

O processo de padronização do μPRN-HRP iniciou-se com análise qualitativa (visual) das variáveis fundamentais do teste. Na figura abaixo (4.5), imagens representativas do primeiro grupo de variáveis avaliadas: I – células Vero ATCC, Meio 199, vírus 17D-213/77.

O preparo das monocamadas celulares (nas placas de 96 poços) 24 horas antes de serem infectadas e a revelação do teste iniciada 48 horas após a infecção resultaram em imagens mais satisfatórias, com perfil de PFU (tamanho, morfologia e distribuição no poço) mais adequado quando comparadas com as demais combinações de tempos avaliadas.



**Figura 4.5: Imagens representativas das variáveis fundamentais e condições testadas no processo de padronização do  $\mu$ PRN-HRP de FA – grupo I.**

Diferentes densidades (células/mL) de células Vero ATCC infectadas com a cepa viral 17D-213/77 (~100 PFU/poço). Tempo de neutralização: 2 horas. Diluição dos anticorpos conjugados (2D12-HRP e 4G2-HRP): 1:1000. Solução fixadora: etanol:metanol. Fotos ScanLab.

Nos ensaios seguintes (figura 4.6), os 4 grupos organizados de acordo com a origem das células Vero e a cepa viral foram avaliados de forma qualitativa para as demais variáveis fundamentais, com os tempos de preparo das monocamadas pré-formadas e revelação do teste fixos (24 e 48 horas, respectivamente), como definido nos primeiros ensaios.

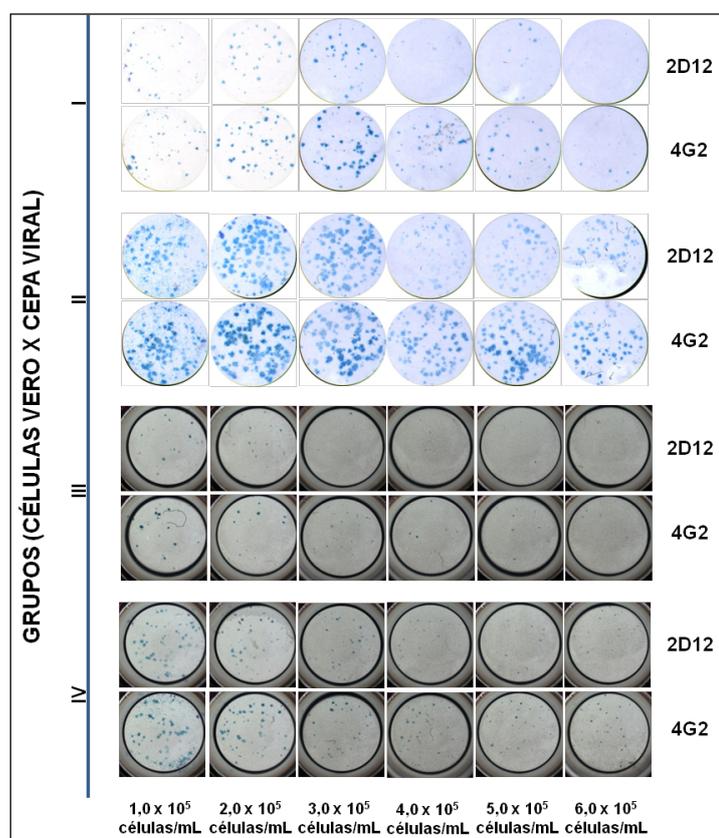
As imagens resultantes desses testes evidenciaram o melhor perfil de PFU para a cepa viral 17D-213/77, com fenótipo mais delimitado e adequado para a visualização em poços de microplacas, comparado ao da cepa 17DD.

Ambas as células Vero ATCC e NIBSC apresentaram monocamadas satisfatórias, com boa confluência. Mas as células Vero ATCC mostraram-se mais

apropriadas para a infecção com a subcepa 17D-213/77, com a obtenção de mais PFU/poço comparado às monocamadas de origem NIBSC.

No entanto, a grande variação observada entre as monocamadas de diferentes poços do mesmo ensaio e entre ensaios diferentes indicou a necessidade de realizar mais testes para determinar a densidade celular.

Ambos os anticorpos conjugados apresentaram desempenho esperado para marcar PFU de FA. O 4G2-HRP pareceu mais eficiente (visualização de maior quantidade de PFU) quando comparado ao 2D12-HRP e, portanto, foi escolhido para continuar a padronização do  $\mu$ PRN-HRP.

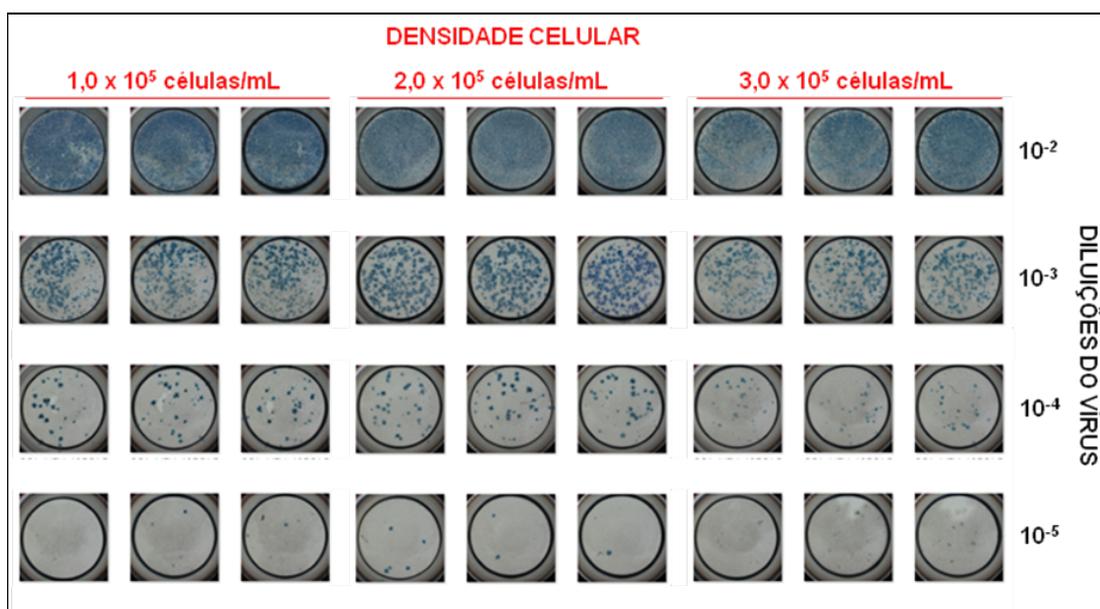


**Figura 4.6: Imagens representativas das variáveis fundamentais e condições testadas no processo de padronização do  $\mu$ PRN-HRP de FA – grupos I-IV.**

Grupo I: célula Vero ATCC (Meio 199) X vírus 17D-213/77; grupo II: célula Vero ATCC (Meio 199) X vírus 17DD; grupo III: célula Vero NIBSC (Meio EMEM) X vírus 17D-213/77; grupo IV: célula Vero NIBSC (Meio EMEM) X vírus 17DD. Diferentes densidades (células/mL) de células infectadas com ~100 PFU/poço de vírus. Tempo de neutralização: 2 horas. Tempo de preparo das monocamadas pré-formadas: 24 horas. Tempo (pós-infecção) para revelação do teste: 48 horas. Diluição dos anticorpos conjugados (2D12-HRP e 4G2-HRP): 1:1000. Solução fixadora: etanol:metanol. Fotos BioSpot (grupos I e II) e ScanLab (grupos III e IV).

Nos ensaios seguintes (figura 4.7), a cepa 17D-213/77 foi submetida à diluição seriada de fator 10 ( $10^{-2}$  –  $10^{-5}$ ) para infectar diferentes densidades celulares:  $1,0 \times 10^5$ ;  $2,0 \times 10^5$  e  $3,0 \times 10^5$  células/mL. As etapas do  $\mu$ PRN-HRP foram seguidas com as variáveis definidas anteriormente: células Vero ATCC, monocamadas pré-formadas 24 horas antes da infecção e revelação 48 horas após a infecção com o anticorpo conjugado 4G2-HRP.

A densidade de  $2,0 \times 10^5$  células/mL apresentou o melhor desempenho, resultando em monocamadas com confluência satisfatória, mais homogêneas em um mesmo poço, mas também com menor variação entre os poços da mesma placa e entre ensaios diferentes.



**Figura 4.7: Imagens representativas de 3 ensaios de  $\mu$ PRN-HRP para a diluição seriada de fator 10 da cepa 17D-213/77.**

Diluições virais (de cima para baixo):  $10^{-2}$  –  $10^{-5}$ . Tempo de preparo das monocamadas pré-formadas de células Vero ATCC: 24 horas. Tempo de neutralização: 2 horas. Tempo (pós-infecção) para revelação do teste: 48 horas. Diluição do anticorpo conjugado (4G2-HRP): 1:500. Solução fixadora: etanol:metanol. Fotos ScanLab.

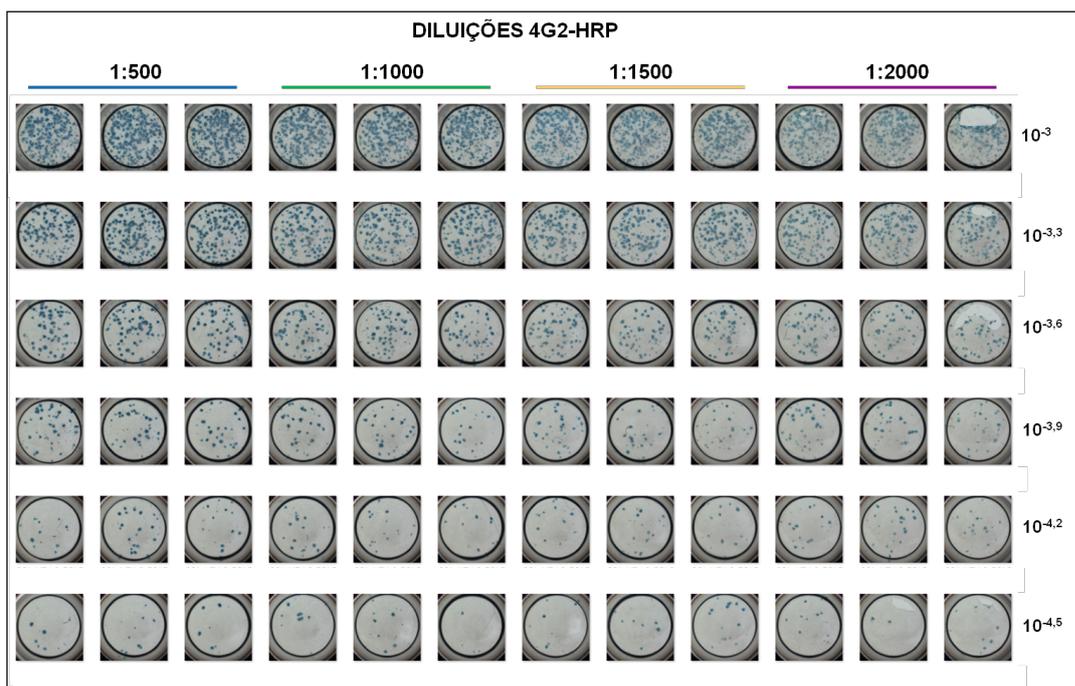
Com a definição das variáveis fundamentais do  $\mu$ PRN-HRP, o processo de padronização desta metodologia continuou com a avaliação do melhor tempo de neutralização: 2 horas, 1 hora e 30 minutos ou 1 hora. Diluições seriadas de fator 2 do vírus ( $10^{-3}$  –  $10^{-4,5}$ ), definidas a partir das diluições de fator 10, foram realizadas para determinar o tempo que resulta em menor variação nas contagens de PFU entre poços da mesma placa e entre ensaios diferentes.

Considerando a importância da diluição ideal do monoclonal 4G2-HRP na marcação e, portanto, visualização e contagem de PFU, essa variável também foi avaliada nessas titulações testando 4 diluições: 1:500; 1:1000; 1:1500; 1:2000.

As figuras 4.8, 4.9 e 4.10 são imagens do mesmo ensaio (representando o total de 10 ensaios), onde cada placa foi submetida a um tempo de neutralização diferente.

Esses ensaios foram analisados de forma quantitativa, em que as imagens obtidas no ScanLab foram transferidas para o Axiovision para a contagem de PFU de FA. No entanto, ainda não havia sido realizado o processo de “teaching and reading” do software. Assim, partiu-se dos parâmetros definidos previamente para dengue 4 (por apresentar fenótipo de PFU similar ao de FA) para permitir que o programa de processamento de imagens contasse PFU de FA de forma exata.

Os dados obtidos apontaram incompatibilidade entre as contagens automatizada (Axiovision) e manual (visual) das imagens. As contagens geradas pelo software estavam subestimadas. Portanto, a manual foi considerada para a determinação do melhor tempo de neutralização.

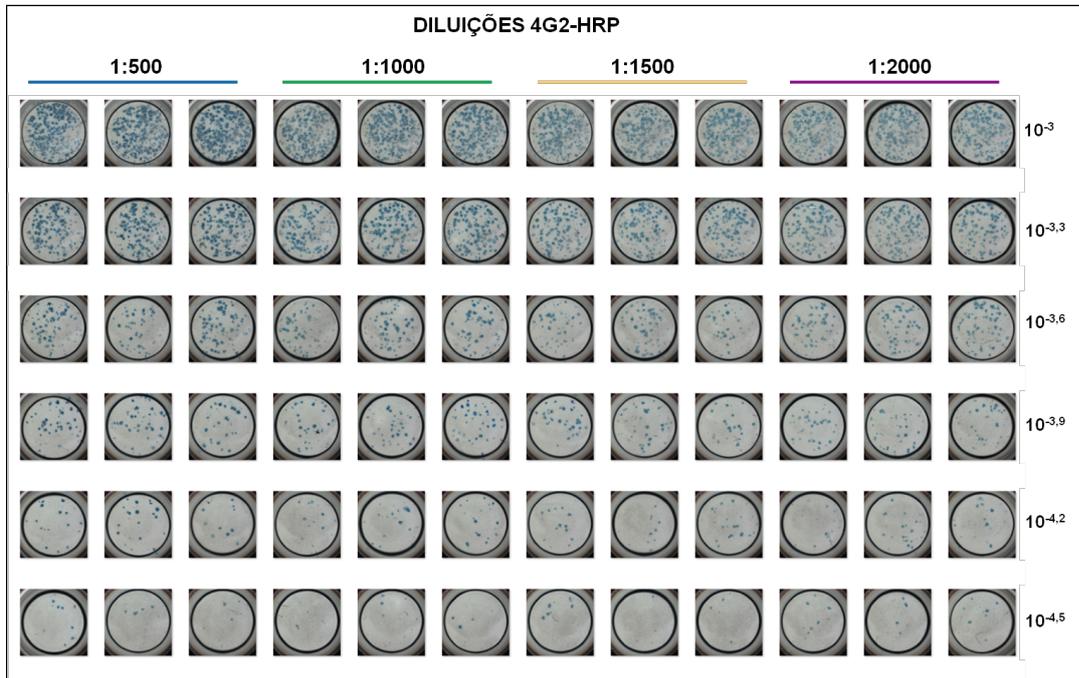


**Figura 4.8: Imagens representativas de 10 ensaios de  $\mu$ PRN-HRP com 2 horas de neutralização para a diluição seriada de fator 2 da cepa 17D-213/77.** Diluições virais (de cima para baixo):  $10^{-3}$  –  $10^{-4.5}$ . O anticorpo conjugado 4G2-HRP foi diluído (1:500; 1:1000; 1:1500; 1:2000) em solução boqueadora. Fotos ScanLab.

As contagens obtidas de todos os ensaios foram organizadas em gráficos do tipo boxplot (figuras 4.11, 4.12, 4.13 e 4.14) para visualizar o grau de dispersão da quantidade de PFU/poço, para cada uma das diluições virais e do anticorpo, em diferentes tempos de neutralização.

O tempo de 2 horas para a etapa de neutralização resultou em quantidade apropriada de PFU/poço (entre 50 e 100), especialmente nas diluições  $10^{-3.3}$  e  $10^{-3.6}$ , para as diferentes diluições do anticorpo avaliadas. Resultados similares foram observados para os demais tempos de neutralização. No entanto, na análise das diluições do vírus que resultaram em contagens ótimas de PFU/poço, observou-se o menor grau de dispersão dos dados de 2 horas de neutralização quando comparados aos dados de 1 hora e 1 hora e 30 minutos.

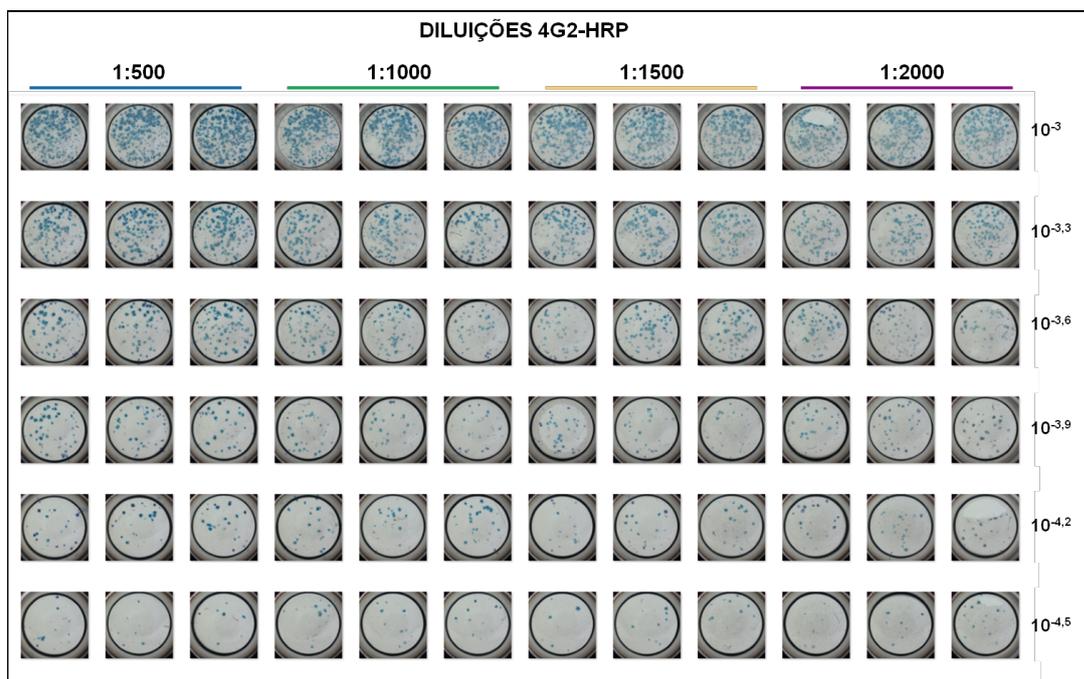
Apesar desses dados terem possibilitado a determinação não somente do melhor tempo de neutralização, mas também as diluições ideais para o vírus e o anticorpo conjugado, estas variáveis foram reavaliadas ao longo do estudo (a cada nova produção de vírus, do anticorpo monoclonal e do substrato TB).



**Figura 4.9: Imagens representativas de 10 ensaios de  $\mu$ PRN-HRP com 1 hora e 30 minutos de neutralização para a diluição seriada de fator 2 da cepa 17D-213/77.** Diluições virais (de cima para baixo):  $10^{-3}$  –  $10^{-4.5}$ . O anticorpo conjugado 4G2-HRP foi diluído (1:500; 1:1000; 1:1500; 1:2000) em solução boqueadora. Fotos ScanLab.

A análise qualitativa dos diferentes ensaios do processo de padronização do  $\mu$ PRN-HRP, com a definição das variáveis fundamentais do teste, evidenciavam a irregularidade no perfil e na qualidade das monocamadas de células. A equipe do setor de células do LATEV reviu os procedimentos de manutenção e passagem das garrafas de células Vero, mas também o preparo das monocamadas pré-formadas em placas de 96 poços.

Conciliando a necessidade já observada pela equipe do LATEV à importância da monocamada de células (íntegra e homogênea) na qualidade do  $\mu$ PRN-HRP, um novo banco de células Vero ATCC foi produzido; o qual apresentou título maior e um PDL ("population doubling level") mais alto do que o banco anterior.



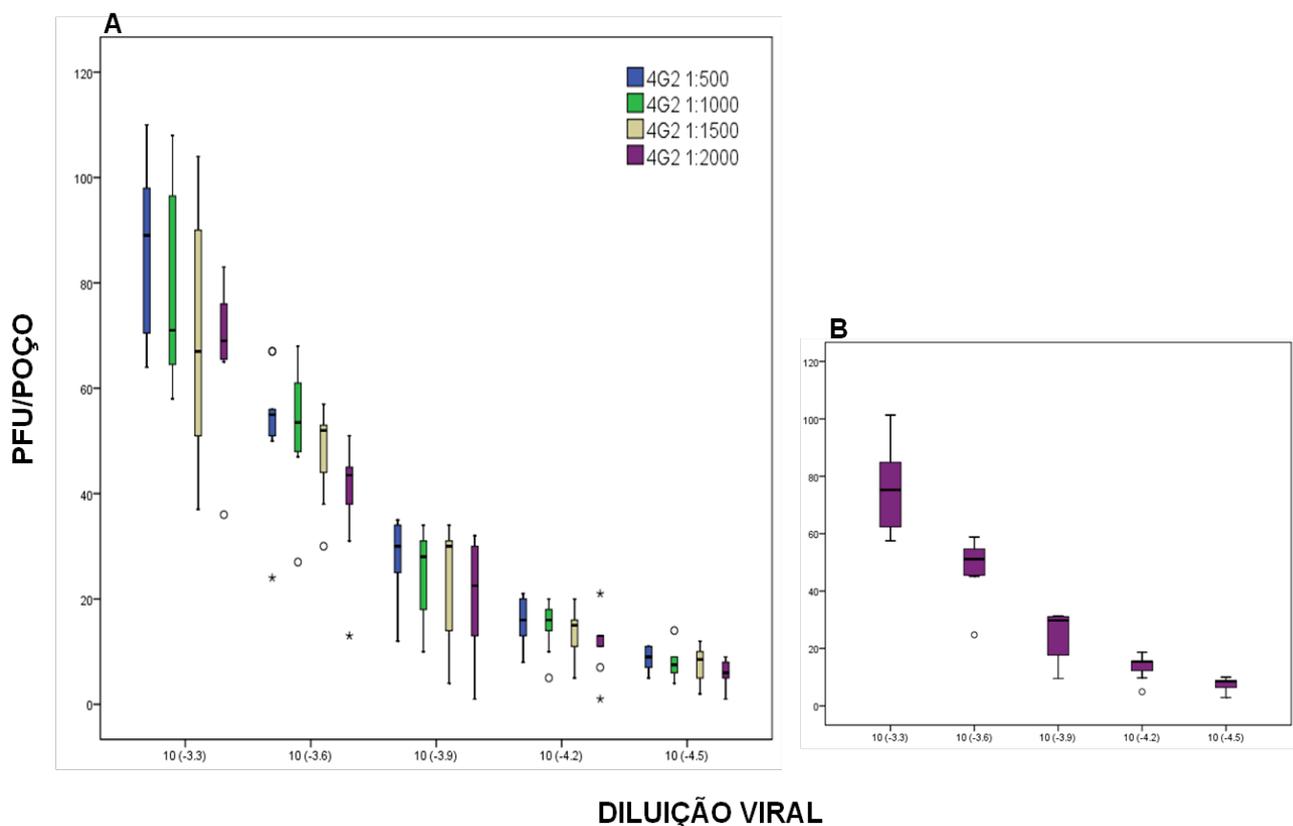
**Figura 4.10: Imagens representativas de 10 ensaios de  $\mu$ PRN-HRP com 1 hora de neutralização para a diluição seriada de fator 2 da cepa 17D-213/77.**

Diluições virais (de cima para baixo):  $10^{-3}$  –  $10^{-4.5}$ . O anticorpo conjugado 4G2-HRP foi diluído (1:500; 1:1000; 1:1500; 1:2000) em solução boqueadora. Fotos ScanLab.

A partir do novo banco de células, produziu-se um novo banco de trabalho da cepa 17D-213/77 (conforme descrito na seção 3.4.1). No mesmo período, um novo lote do anticorpo conjugado 4G2-HRP também foi produzido, além da disponibilidade de um novo lote do reagente TB.

Ensaio de  $\mu$ PRN-HRP utilizando somente o vírus diluído de forma seriada foram realizados para avaliar: as diluições ideais das novas produções de 4G2-HRP e do vírus 17D-213/77; a qualidade das monocamadas de células Vero ATCC do banco recém-produzido; e o desempenho do novo lote de TB.

## NEUTRALIZAÇÃO: 2 HORAS



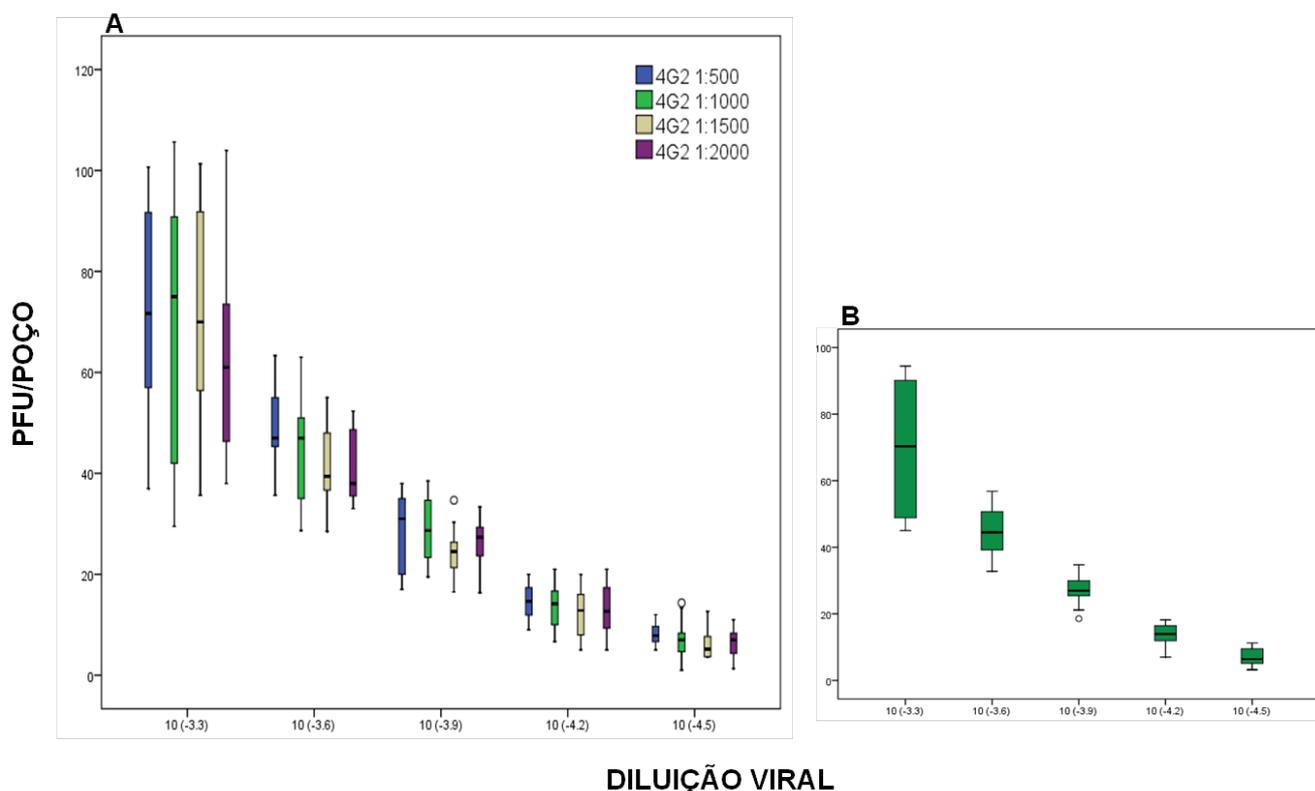
**Figura 4.11: Boxplots das contagens de PFU/poço das titulações de fator 2, simulando o  $\mu$ PRN-HRP, com tempo de neutralização de 2 horas.**

Eixo X: diluições virais da cepa 17D-213/77 ( $10^{-3.3}$  -  $10^{-4.5}$ ). Eixo Y: quantidade de PFU/poço (médias das replicatas de 10 ensaios). **A:** quantidades de PFU/poço obtidas nas diferentes diluições virais avaliadas e em cada diluição do 4G2-HRP (azul = 1:500; verde = 1:1000; amarelo = 1:1500; roxo = 1:2000). **B:** quantidades de PFU/poço obtidas nas diferentes diluições virais avaliadas, considerando a unificação dos dados obtidos das diferentes diluições do 4G2-HRP. SPSS V.17.0.

Primeiramente, ensaios foram realizados testando o vírus diluído no fator 10 ( $10^{-2}$  -  $10^{-7}$ ) e o anticorpo em 4 diluições (1:500, 1:1000, 1:1500 e 1:2000) (figura 4.15).

A partir da análise desses dados, ensaios simulando o  $\mu$ PRN-HRP foram realizados testando o vírus diluído no fator 2 ( $10^{-4}$  -  $10^{-5.5}$ ) e o anticorpo em 2 diluições (1:1000 e 1:1500) (figura 4.16).

## NEUTRALIZAÇÃO: 1 HORA E 30 MINUTOS



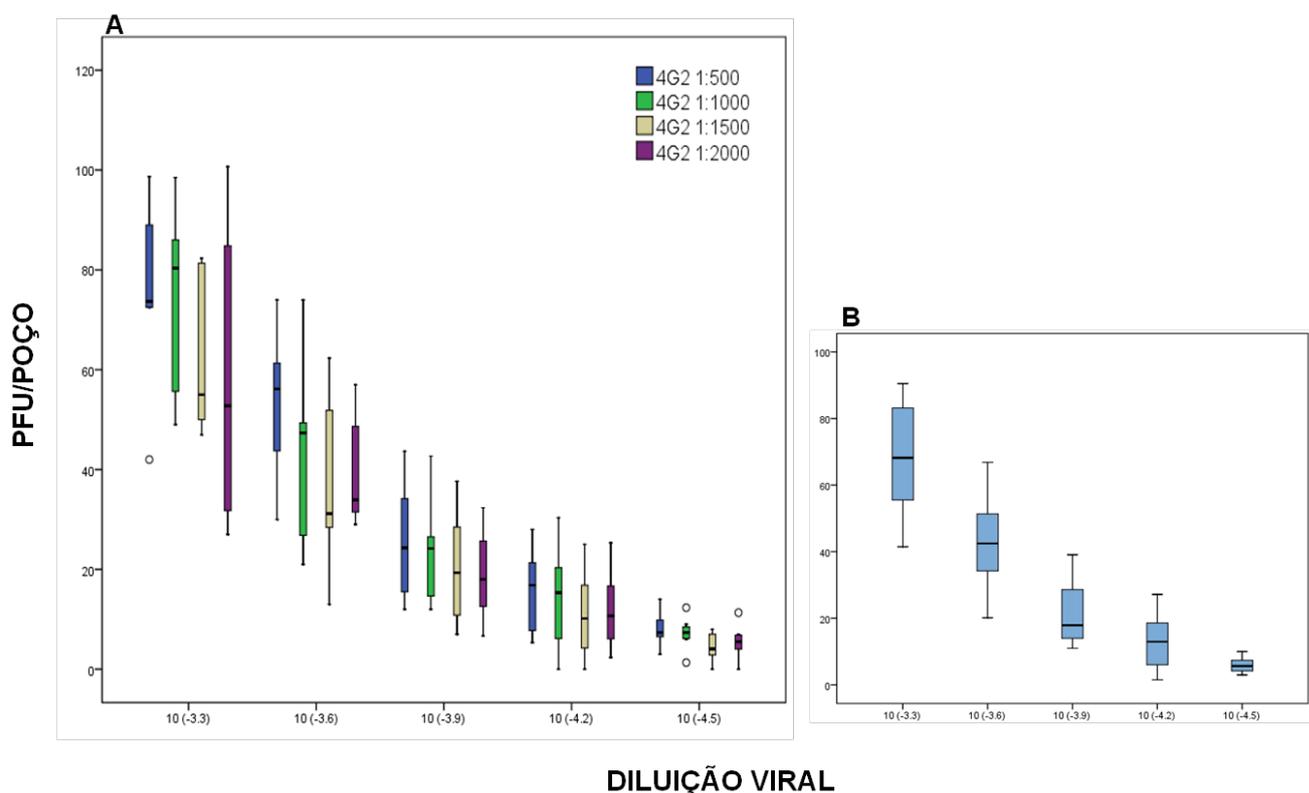
**Figura 4.12: Boxplots das contagens de PFU/poço das titulações de fator 2, simulando o  $\mu$ PRN-HRP, com tempo de neutralização de 1 hora e 30 minutos.**

Eixo X: diluições virais da cepa 17D-213/77 ( $10^{-3.3}$  -  $10^{-4.5}$ ). Eixo Y: quantidade de PFU/poço (médias das replicatas de 10 ensaios). A: quantidades de PFU/poço obtidas nas diferentes diluições virais avaliadas e em cada diluição do 4G2-HRP (azul = 1:500; verde = 1:1000; amarelo = 1:1500; roxo = 1:2000). B: quantidades de PFU/poço obtidas nas diferentes diluições virais avaliadas, considerando a unificação dos dados obtidos das diferentes diluições do 4G2-HRP. SPSS V.17.0.

As imagens mostraram melhora considerável da monocamada de células, com diminuição dos grumos (aglomerações de células) e perfil menos heterogêneo entre poços da mesma placa e entre poços de placas diferentes ou de ensaios distintos.

Os dados obtidos indicaram as diluições ideais do vírus ( $10^{-4.9}$ ) e do anticorpo (1:1000). No entanto, o processamento das imagens no Axiovision continuou apontando inconsistências nas contagens, apesar dos ajustes necessários e possíveis para o melhor reconhecimento de PFU de FA pelo software tivessem sido realizados.

## NEUTRALIZAÇÃO: 1 HORA



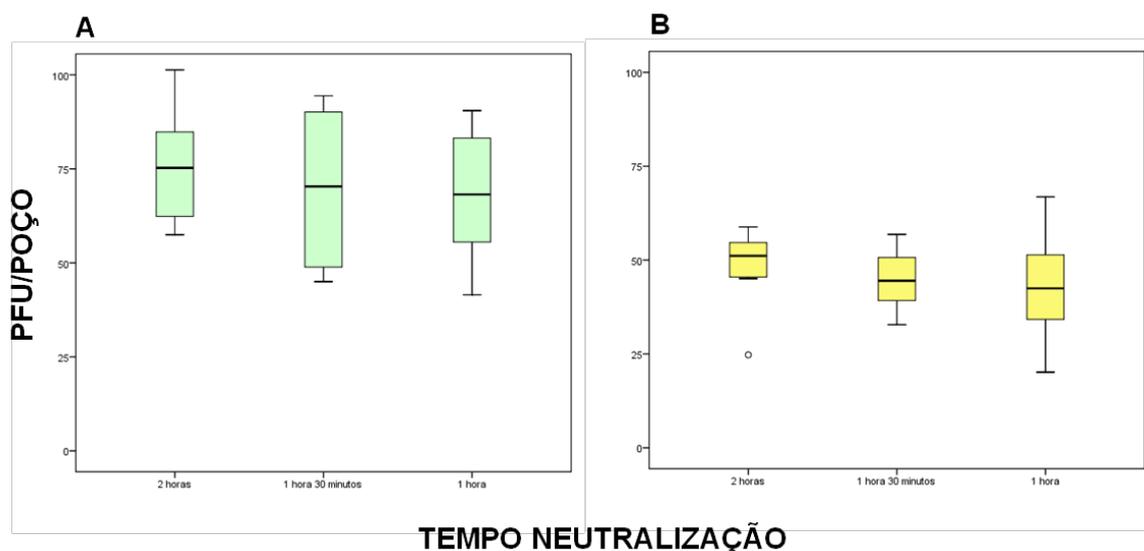
**Figura 4.13: Boxplots das contagens de PFU/poço das titulações de fator 2, simulando o  $\mu$ PRN-HRP, com tempo de neutralização de 1 hora.**

Eixo X: diluições virais da cepa 17D-213/77 ( $10^{-3.3}$  -  $10^{-4.5}$ ). Eixo Y: quantidade de PFU/poço (médias das replicatas de 10 ensaios). **A**: quantidades de PFU/poço obtidas nas diferentes diluições virais avaliadas e em cada diluição do 4G2-HRP (azul = 1:500; verde = 1:1000; amarelo = 1:1500; roxo = 1:2000). **B**: quantidades de PFU/poço obtidas nas diferentes diluições virais avaliadas, considerando a unificação dos dados obtidos das diferentes diluições do 4G2-HRP. SPSS V.17.0.

A experiência do grupo e a ineficiência na contagem pelo Axiovision destacaram a variação de tamanhos – alguns pequenos, mas a maioria muito grande para a área do poço – da população de PFUs do vírus da FA.

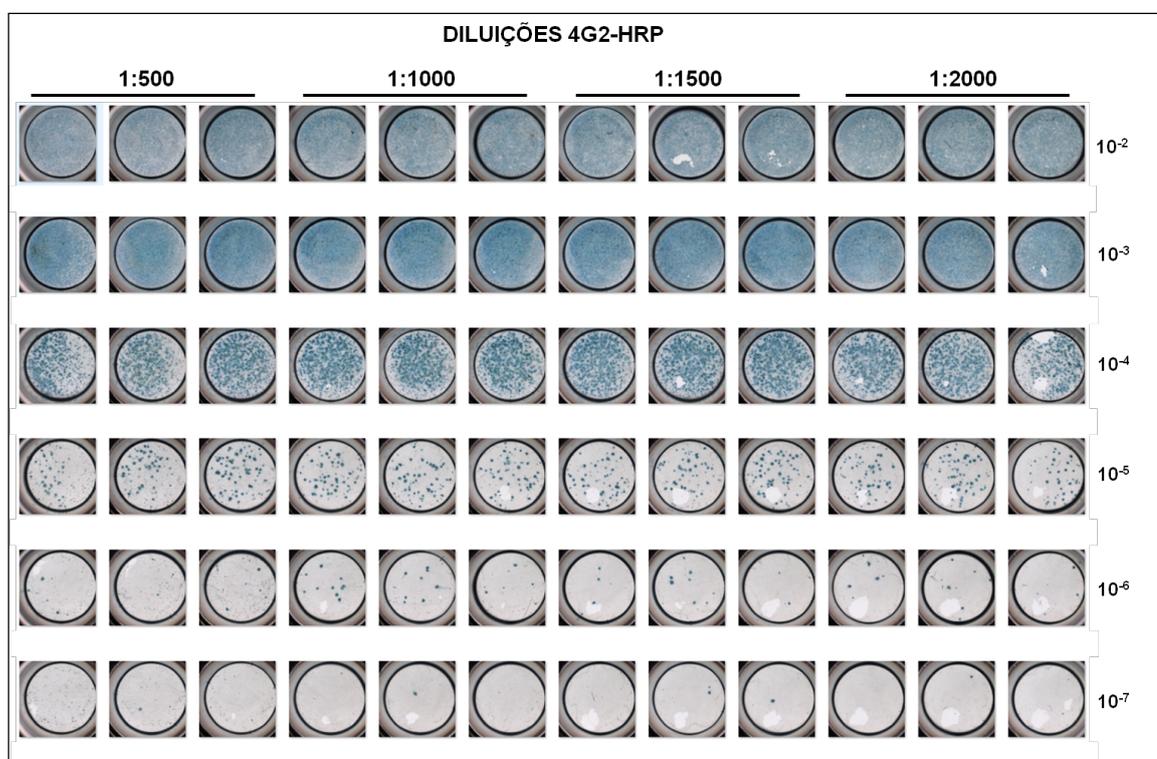
Concluiu-se que a padronização do  $\mu$ PRN-HRP de FA não poderia avançar sem que o tamanho de PFU fosse compatível com a placa de 96 poços e a sua contagem pelo Axiovision fosse ajustada.

O processo de padronização da técnica continuou com a avaliação do uso do meio semissólido, objetivando a diminuição do tamanho e a redução da heterogeneidade da população de PFU de FA; o que, conseqüentemente, melhoraria a contagem automatizada pelo Axiovision.



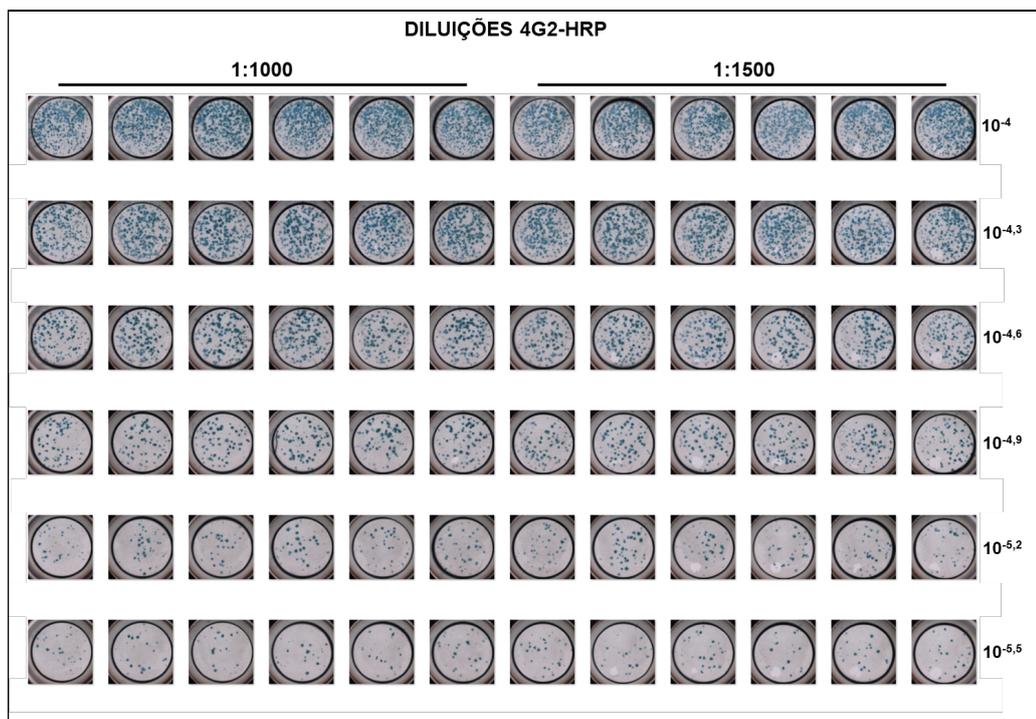
**Figura 4.14: Boxplots das contagens de PFU/poço das titulações de fator 2, simulando o  $\mu$ PRN-HRP, nos diferentes tempos de neutralização avaliados e considerando a unificação das diferentes diluições do 4G2-HRP.**

**(A)** diluição da cepa 17D-213/77:  $10^{-3.3}$ . **(B)** diluição da cepa 17D-213/77:  $10^{-3.6}$ . Eixo X: tempos de neutralização (2 horas, 1 hora e 30 minutos e 1 hora). Eixo Y: quantidade de PFU/poço (médias das replicatas de 10 ensaios). SPSS V.17.0.



**Figura 4.15: Imagens representativas de 2 ensaios de  $\mu$ PRN-HRP para a diluição seriada de fator 10 da cepa 17D-213/77.**

Diluições virais (de cima para baixo):  $10^{-2}$  –  $10^{-7}$ . O anticorpo conjugado 4G2-HRP foi diluído (1:500; 1:1000; 1:1500; 1:2000) em solução boqueadora. Fotos ScanLab.



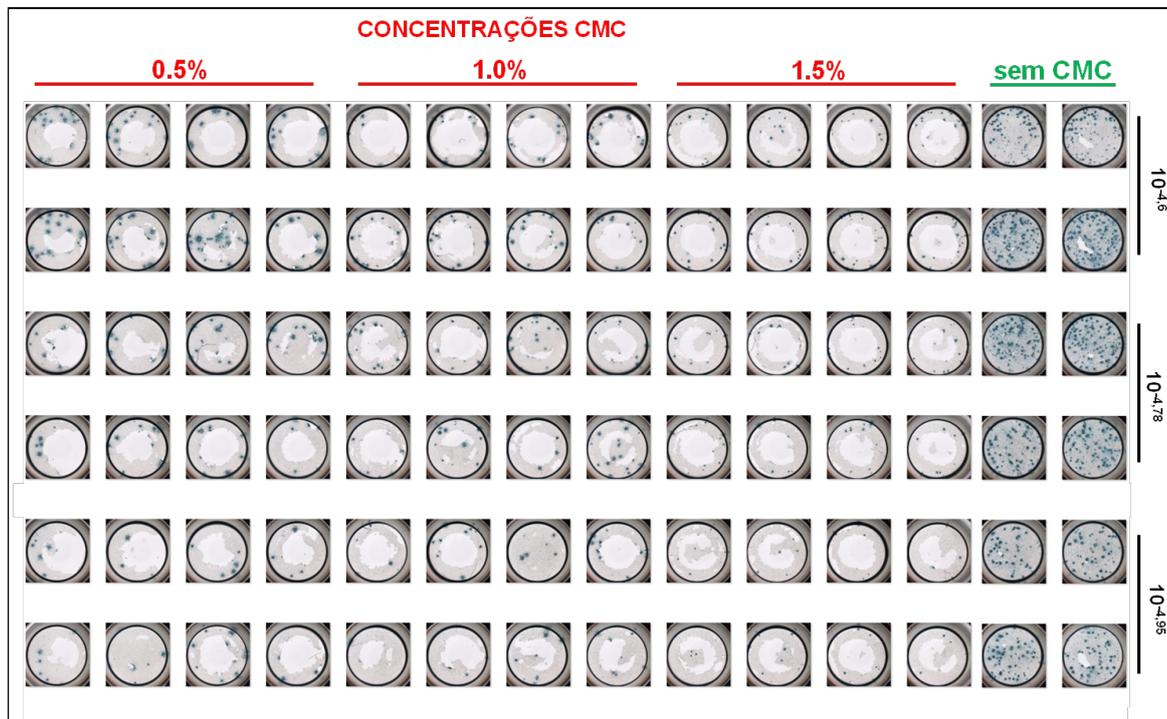
**Figura 4.16: Imagens representativas de 3 ensaios de  $\mu$ PRN-HRP para a diluição seriada de fator 2 da cepa 17D-213/77.**

Diluições virais (de cima para baixo):  $10^{-4}$  –  $10^{-5.5}$ . O anticorpo conjugado 4G2-HRP foi diluído (1:1000; 1:1500) em solução boqueadora. Fotos ScanLab.

A primeira tentativa de melhora do perfil e tamanho da população de PFU da cepa 17D-213/77 foi a realização da metodologia do  $\mu$ PRN-HRP utilizando somente vírus diluído ( $10^{-4.6}$  –  $10^{-4.95}$ ), testando as seguintes concentrações do meio semissólido: 0,5%, 1,0% e 1,5% (figura 4.17). Após o período de 2 horas para a etapa de neutralização e a transferência das misturas vírus + meio para a placa contendo as monocamadas pré-formadas, esta foi incubada por somente 1 hora para que seu conteúdo (vírus + meio) fosse substituído pelo meio semissólido e as monocamadas fossem incubadas novamente por 48 horas.

A análise qualitativa das imagens mostrou que o uso do meio semissólido impediu o aparecimento de PFUs muito pequenos. Estes eram classificados como infecções secundárias e, por apresentarem perfil muito diferente (de tamanho e coloração), contribuía para a heterogeneidade da população de PFU, dificultando a definição dos parâmetros do Axiovision para a contagem acurada de PFU de FA.

No entanto, devido à necessidade de lavagens adicionais para a retirada do meio semissólido, muitos danos nas monocamadas foram observados. Ademais, o perfil de PFU continuou grande e inadequado para os poços de placas de 96 poços.



**Figura 4.17: Imagens representativas de 3 ensaios de  $\mu$ PRN-HRP testando diferentes concentrações do meio semissólido.**

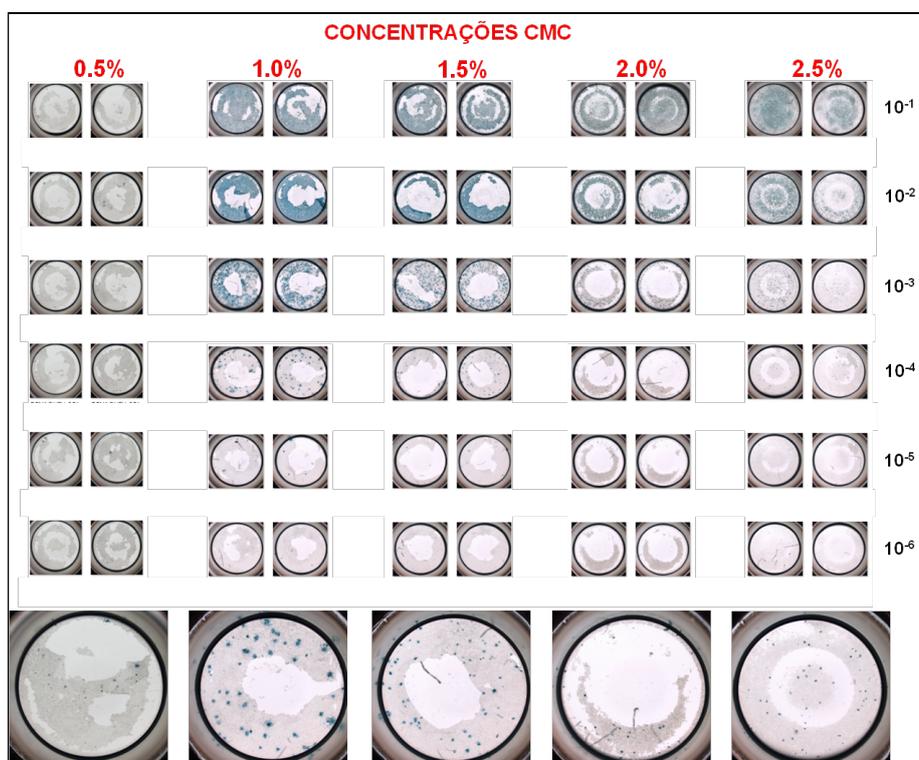
Concentrações de CMC avaliadas: 0,5%, 1,0% e 1,5%. Diluições da cepa 17D-213/77 (de cima para baixo):  $10^{-4.6}$ ;  $10^{-4.78}$ ;  $10^{-4.95}$ . As duas últimas colunas à esquerda não receberam meio semissólido (controle comparativo). Fotos ScanLab.

A estratégia alternativa foi continuar avaliando o uso do meio semissólido mas diminuir o tempo de revelação do teste, de 48 para 36 horas, na tentativa de diminuição do tamanho de PFU.

Ensaio seguindo as etapas predefinidas para o protocolo do  $\mu$ PRN-HRP foram realizados utilizando, novamente, somente vírus em diferentes diluições ( $10^{-1}$  –  $10^{-6}$ ) e testando, além das anteriores (0,5%, 1,0% e 1,5%), as concentrações 2,0% e 2,5% do meio semissólido (figura 4.18).

As concentrações de 2,0% e 2,5% do meio semissólido resultaram em população homogênea de PFUs com características convenientes, menores e bem definidos, facilitando a individualização de cada PFU. A ausência de PFUs de infecção secundária também foi observada.

Porém, os problemas de lavagem para a retirada do CMC permaneceram, com boa parte das monocamadas danificada. Além disso, uma incubação adicional ao protocolo de 1 hora antes da adição do meio semissólido e a revelação do teste em 36 horas não se mostrou muito operacional. O teste se tornou mais longo e foi necessário realizar as etapas de neutralização, infecção viral das monocamadas e adsorção no período da tarde para que fosse possível iniciar a revelação no período da manhã, após as 36 horas de incubação.



**Figura 4.18: Imagens representativas de 3 ensaios de  $\mu$ PRN-HRP testando diferentes concentrações do meio semissólido e revelação em 36 horas.**

Concentrações de CMC avaliadas: 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%. Diluições da cepa 17D-213/77 (de cima para baixo):  $10^{-1}$  –  $10^{-6}$ . As imagens ampliadas à baixo são representativas de cada concentração avaliada do CMC. Fotos ScanLab.

Assim, nos ensaios seguintes, duas propostas foram avaliadas: 1) revelação em 36 horas, sem uso de CMC (figura 4.19); 2) revelação em 48 horas, utilizando CMC (figuras 4.20 e 4.21).

Apesar da ausência de danos nas monocamadas, as imagens revelaram a obtenção de PFUs heterogêneos e marcação (tons de azul) mais clara do que a esperada para a revelação em 36 horas sem utilizar o meio semissólido.

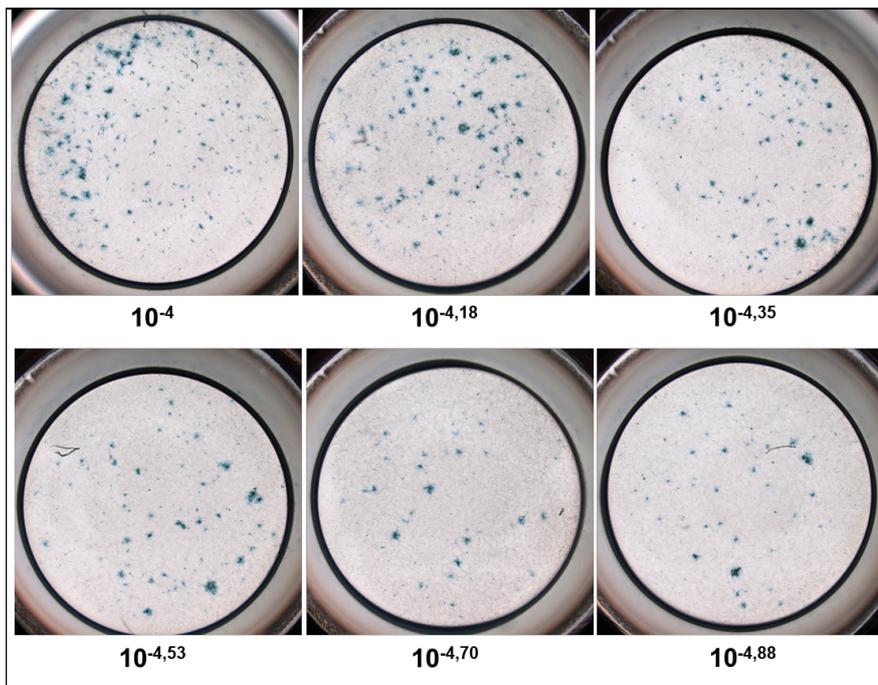
Para a avaliação do  $\mu$ PRN-HRP com revelação 48 horas após a etapa de adsorção, diluições virais de fator 10 ( $10^{-3,7}$  –  $10^{-6}$ ) foram realizadas para testar não somente diferentes concentrações do meio semissólido (1,0%, 1,5% e 2,0%), mas também 2 tipos de solução fixadora (formaldeído 10% e etanol:metanol) e 3 protocolos de lavagem para a retirada do CMC (figura 4.20) antes de iniciar as etapas de revelação (figura 4.21).

A análise visual das imagens mostrou a ineficiência da solução de formaldeído 10% comparada à fixação com etanol:metanol. As monocamadas que receberam o meio semissólido a 2,0% e foram fixadas com a solução de etanol:metanol, à exceção do protocolo 1, apresentaram resultados melhores, com população homogênea de PFUs, pequenos e adequados à área do poço da microplaca. No entanto, os danos nas monocamadas continuaram ocorrendo, mesmo nos protocolos 2 e 3.

Na tentativa de aprimorar o processo de lavagem para a retirada do CMC, outros ensaios foram realizados testando as mesmas condições (revelação em 48 horas com diferentes concentrações de CMC e protocolos de lavagem), mas utilizando, pela primeira vez, soros positivos (M7 e M7/10) e negativo (AA61) para anticorpos neutralizantes para FA (figura 4.22).

As imagens continuaram evidenciando o desempenho do meio semissólido a 2,0% na obtenção de perfil apropriado de PFU. Mas os danos nas monocamadas, apesar de terem sido minimizados, não foram evitados, mesmo nos protocolos 2 e 3 de lavagem.

Apesar do protocolo de lavagem mais eficiente para a remoção do meio semissólido continuar indefinido e a permanência de danos nas monocamadas, esses ensaios foram utilizados para iniciar o processo de “teaching and reading” do Axiovision para a contagem de PFU de FA. A coloração (resultante do reagente TB) mais clara na marcação de PFUs foi observada durante esse processo.



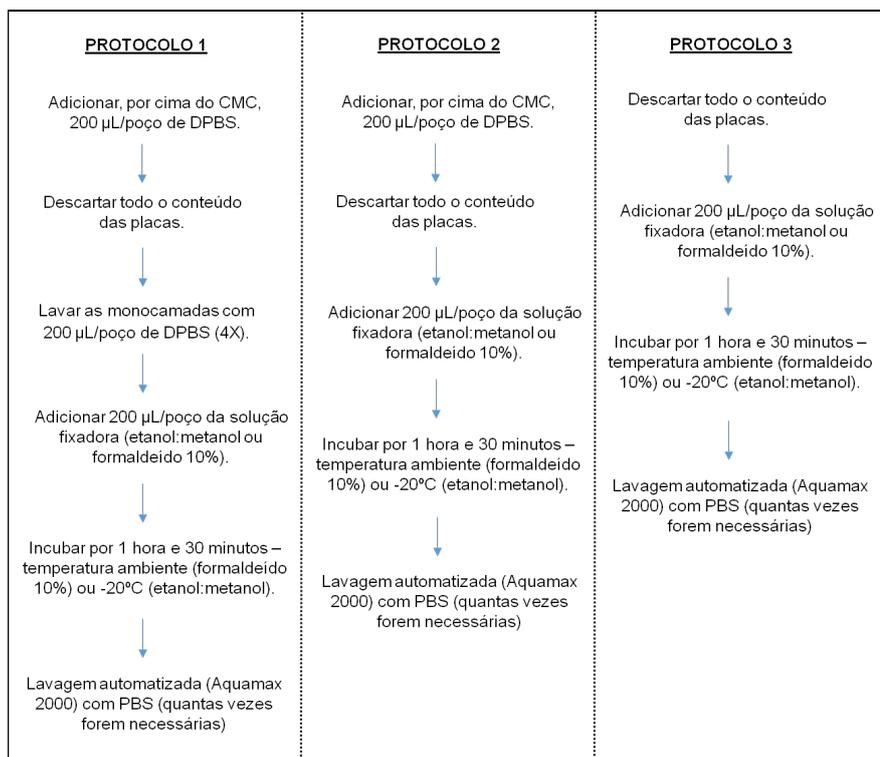
**Figura 4.19: Imagens representativas de 2 ensaios de  $\mu$ PRN-HRP, sem CMC e revelação em 36 horas.**

Diluições da cepa 17D-213/77:  $10^{-4}$  –  $10^{-4,88}$  (fator 1.5 de diluição). Fotos ScanLab.

A marcação fraca e/ou com tonalidade variável entre poços/placas diferentes interfere diretamente na definição dos parâmetros de contagem automatizada, mas também no próprio processo de padronização do teste por dificultar a determinação das diluições ideais do vírus e do anticorpo monoclonal.

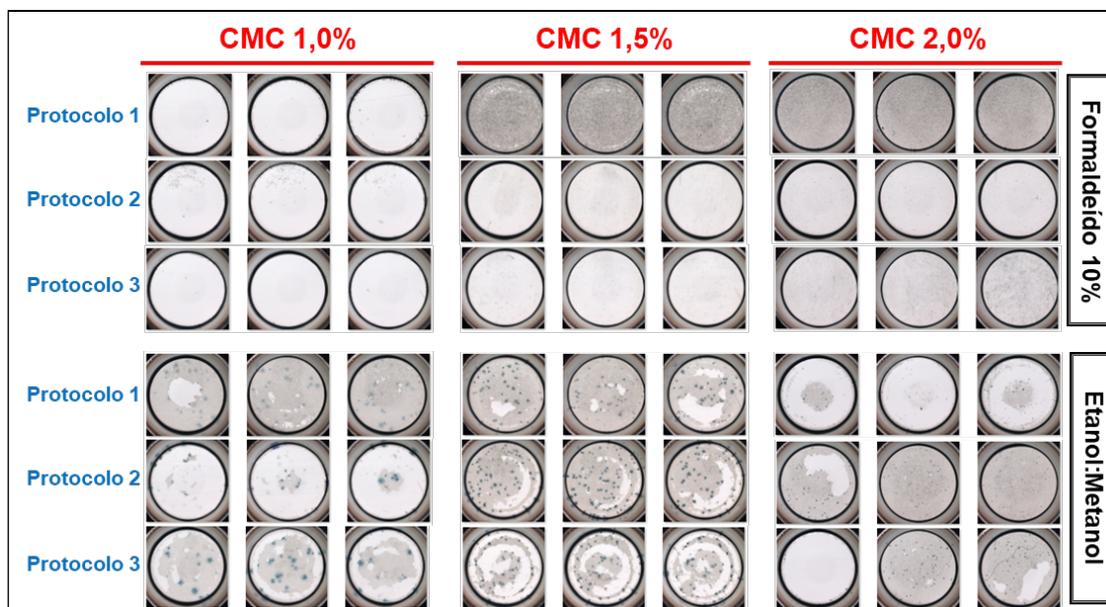
Para demonstrar a importância de se utilizar o TB dentro dos 14 primeiros meses de fabricação no processo de padronização da técnica, ensaios de  $\mu$ PRN-HRP foram realizados comparando 2 lotes de TB: um com 19 meses de fabricação (o mesmo utilizado nos ensaios já apresentados) e outro com 10 meses de fabricação (figura 4.23).

As imagens obtidas evidenciaram a diferença na coloração dos poços que receberam o TB com mais de 14 meses de fabricação quando comparado ao reagente que havia sido fabricado há 10 meses.



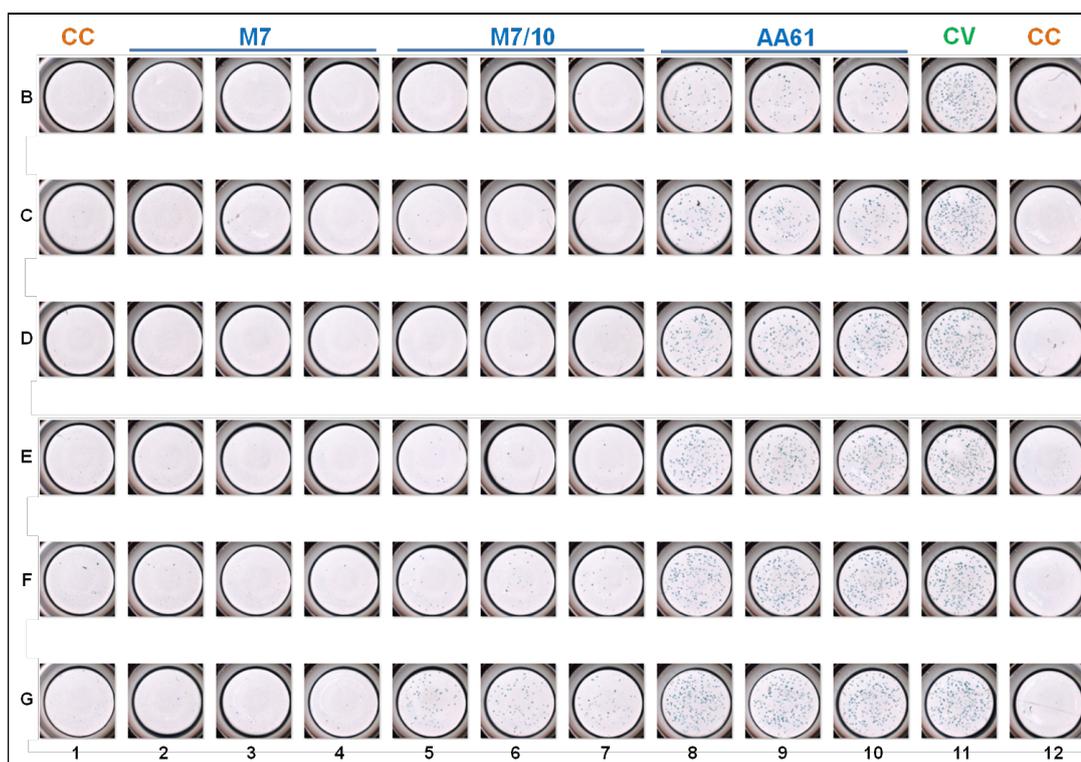
**Figura 4.20: Protocolos de lavagem para retirada do meio semissólido das placas de µPRN-HRP.**

Protocolos de lavagem aplicados 48 horas após a realização das etapas de neutralização, infecção viral e adsorção. As etapas descritas antecedem o processo de revelação do teste (adição do anticorpo conjugado). Uma placa de cada ensaio foi destinada para cada protocolo.



**Figura 4.21: Imagens representativas de 6 ensaios de µPRN-HRP com 48 horas para revelação, testando diferentes concentrações do meio semissólido, soluções fixadoras e protocolos de lavagem.**

Concentrações de CMC avaliadas: 1,0%, 1,5%, 2,0%. Soluções fixadoras avaliadas: formaldeído 10% e etanol:metanol. Diluição viral:  $10^{-4,3}$ . Fotos ScanLab.



**Figura 4.22: Imagens da placa resultante da adição de CMC a 2,0% e do protocolo 3 para sua remoção, representativas do teste piloto de  $\mu$ PRN-HRP avaliando diferentes concentrações do meio semissólido e protocolos de lavagem.**

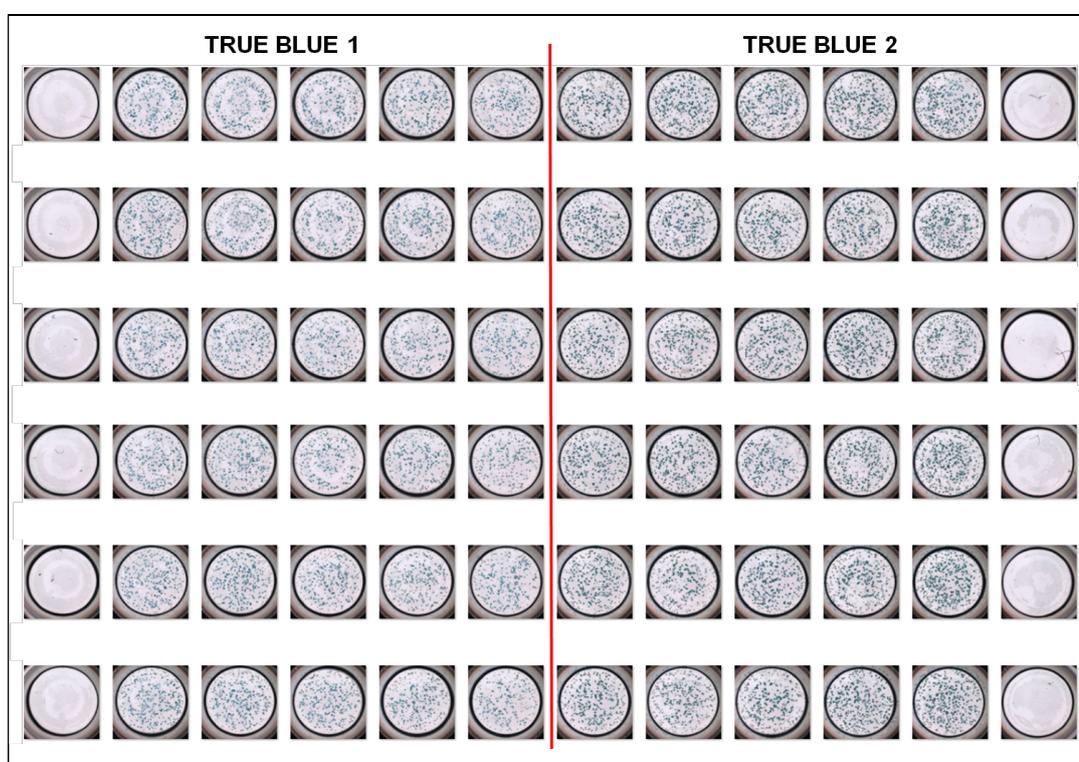
Soros com diferentes níveis de anticorpos neutralizantes para FA (M7; M7/10 e AA61) foram submetidos à diluição seriada de fator 3 em Meio 199 (1:6 – 1:1458, da linha B para G) e neutralizados com quantidade fixa da cepa 17D-213/77 (diluição  $10^{-3,58}$ ). Os processos de lavagem, fixação (etanol:metanol) e revelação foram iniciados 48 horas após a adição do meio semissólido. Colunas 1 e 12, linhas A e H (não incluídas na figura): CC = controle de células. Coluna 11: CV = controle de vírus. Fotos ScanLab.

Para finalizar a padronização do  $\mu$ PRN-HRP, ainda era necessário aprimorar a lavagem para a remoção do meio semissólido sem danificar as monocamadas. Protocolos alternativos utilizando uma ducha de chuveiro (“chuveirinho”) foram avaliados (figura 4.24).

Para testar os protocolos alternativos de retirada do meio semissólido, ensaios de  $\mu$ PRN-HRP foram realizados utilizando somente o vírus em concentração única. Após a etapa de adsorção, o meio semissólido foi adicionado às monocamadas e, 48 horas depois, cada microplaca foi submetida a um processo de lavagem diferente (protocolos 3 a 10, totalizando 8 placas por ensaio) (figura 4.25).

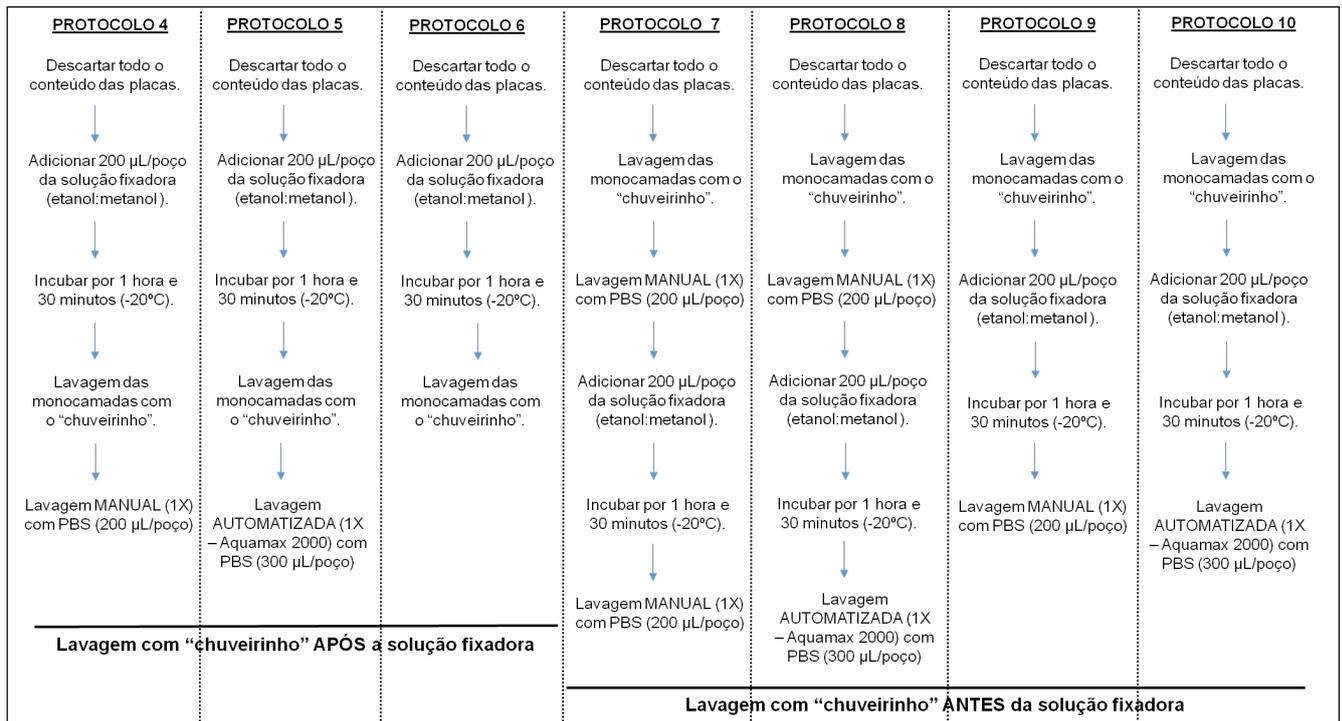
O protocolo 3, como já havia sido observado, resultou em pequenos mas consideráveis danos nas monocamadas. As placas submetidas aos três protocolos em que a lavagem foi feita com “chuveirinho” após a incubação com a solução

fixadora (4, 5 e 6) apresentaram muitos danos nas monocamadas, inviabilizando a contagem de PFUs. Já as placas correspondentes aos protocolos 7, 8, 9 e 10 apresentaram monocamadas íntegras e homogêneas. O protocolo 9 chamou a atenção não somente pela qualidade das monocamadas mas também a clareza na visualização de PFUs, com bom contraste entre o fundo (as monocamadas) e os pontos azuis (PFUs marcados), mesmo que se tenha utilizado o TB com 19 meses de fabricação.



**Figura 4.23: Imagens representativas de 2 ensaios de  $\mu$ PRN-HRP para a avaliação de diferentes lotes de TB.**

TB 1: 19 meses de fabricação; TB 2: 10 meses de fabricação. Toda a placa, com exceção das bordas (controles de células) recebeu uma suspensão viral na diluição  $10^{-3,6}$ . O protocolo 3 de lavagem para a retirada do meio semissólido (2,0%) foi realizado e a fixação com a solução de etanol:metanol. Fotos ScanLab.



**Figura 4.24: Protocolos de lavagem com "chuveirinho" para retirada do meio semissólido das placas de µPRN-HRP.**

As etapas descritas antecedem o processo de revelação do teste (adição do anticorpo conjugado). Uma placa de cada ensaio foi destinada para cada protocolo.

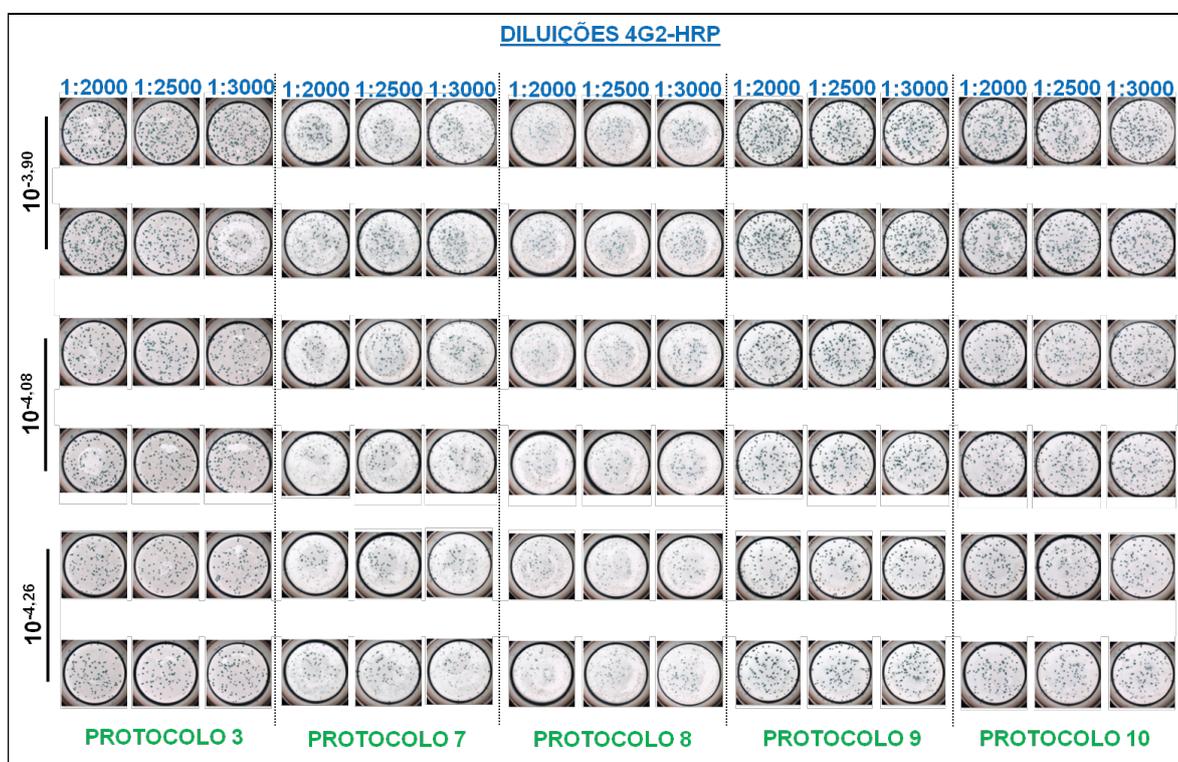


**Figura 4.25: Imagens representativas de 2 ensaios de µPRN-HRP testando diferentes protocolos de lavagem para retirada do CMC.**

Diluição viral única para todos os poços ( $10^{-3,6}$ ). Fotos ScanLab.

Os protocolos de lavagem 3, 7, 8, 9 e 10 foram repetidos, mas agora utilizando um TB com 13 meses de fabricação. As etapas estabelecidas durante a padronização do  $\mu$ PRN-HRP foram seguidas para testar diferentes diluições da cepa 17D-213/77 ( $10^{-3,9}$ ;  $10^{-4,08}$ ;  $10^{-4,26}$ ) e um novo lote do 4G2-HRP (1:2000, 1:2500, 1:3000) (figura 4.26).

As imagens obtidas repetiram o sucesso observado nos ensaios anteriores dos protocolos de lavagem 3, 9 e 10 (especialmente os protocolos 9 e 10), sem danos nas monocamadas e boa marcação de PFUs. A análise qualitativa das imagens também indicou a diluição 1:3000 do novo conjugado e a diluição viral  $10^{-4,26}$ .

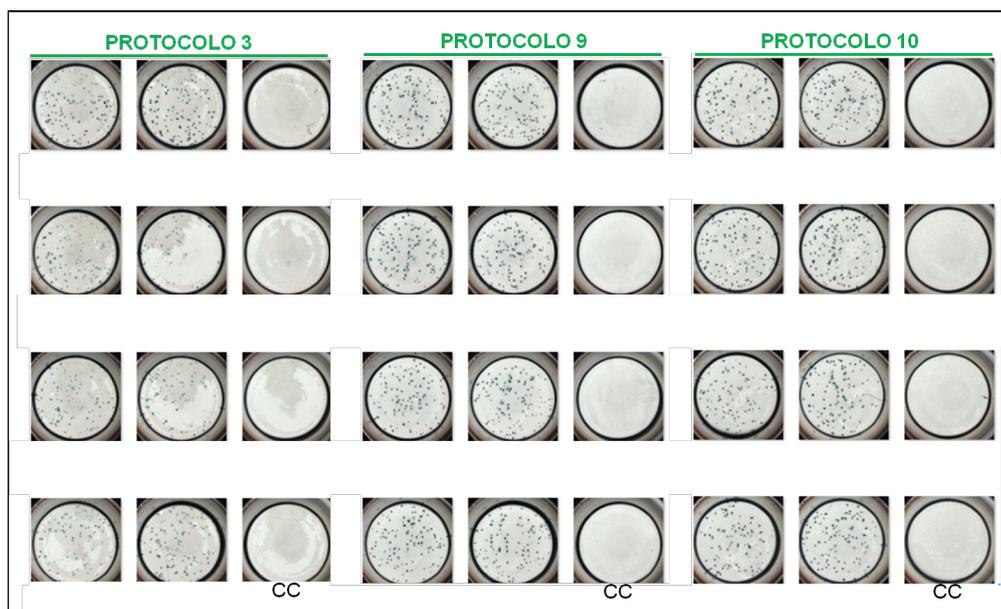


**Figura 4.26: Imagens representativas de 3 ensaios de  $\mu$ PRN-HRP testando diferentes protocolos de lavagem, diluições do vírus e do anticorpo conjugado.**

Diluições da cepa 17D-213/77 (de cima para baixo):  $10^{-3,9}$ ;  $10^{-4,08}$ ;  $10^{-4,26}$ . Protocolos de lavagem para retirada do CMC (2,0%): 3, 7, 8, 9 e 10. Diluições avaliadas do 4G2-HRP: 1:2000, 1:2500, 1:3000. Fotos ScanLab.

Mais 3 ensaios foram realizados utilizando diluições únicas do vírus ( $10^{-4,26}$ ) e do 4G2-HRP (1:3000), mas testando os 3 melhores protocolos de lavagem (3, 9 e 10) (figura 4.27).

A análise das imagens confirmou o melhor desempenho dos protocolos 9 e 10 na obtenção de monocamadas e PFUs satisfatórios para a visualização e contagem automatizada da metodologia em placas de 96 poços. Definiu-se também as diluições ideais do vírus e do anticorpo conjugado:  $10^{-4,26}$  e 1:3000, respectivamente, resultando em quantidade razoável (boa distribuição no poço e fácil individualização) de, aproximadamente, 70 PFU/poço.



**Figura 4.27: Imagens representativas de 3 ensaios de  $\mu$ PRN-HRP testando diferentes protocolos de lavagem.**

Diluição única da cepa 17D-213/77:  $10^{-4,26}$ . Protocolos de lavagem avaliados para retirada do CMC (2,0%): 3, 9 e 10. Diluição única do 4G2-HRP: 1:3000. CC = controle de células. Fotos ScanLab.

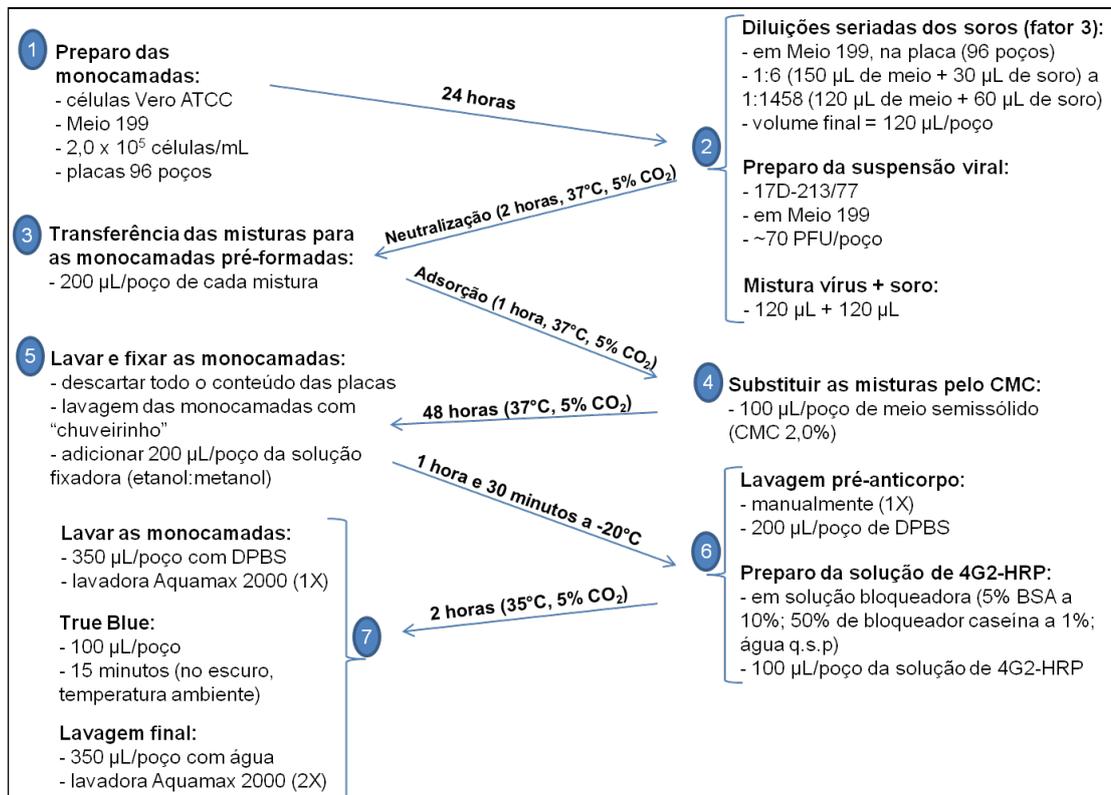
O processamento das imagens referentes aos protocolos 9 e 10 no Axiovision e a análise visual cautelosa da contagem obtida de forma automatizada demonstraram a eficiência do software no reconhecimento acurado e sistematizado de PFUs de FA.

A finalização da padronização do  $\mu$ PRN-HRP com a determinação das variáveis do teste (quadro 4.14) significou a adaptação da metodologia para FA, a qual havia sido inicialmente padronizada para a determinação de anticorpos neutralizantes para os quatro sorotipos do vírus da dengue.

**Quadro 4.14:** Condições testadas e escolhidas das variáveis do  $\mu$ PRN-HRP de FA avaliadas na padronização.

VARIÁVEIS	CONDIÇÕES TESTADAS	CONDIÇÕES ESCOLHIDAS
células Vero	ATCC NIBSC	ATCC
tempo preparo monocamadas pré-formadas	24 horas 48 horas	24 horas
densidade celular	1,0 x 10 <sup>5</sup> células/mL 2,0 x 10 <sup>5</sup> células/mL 3,0 x 10 <sup>5</sup> células/mL 4,0 x 10 <sup>5</sup> células/mL 5,0 x 10 <sup>5</sup> células/mL 6,0 x 10 <sup>5</sup> células/mL	2,0 x 10 <sup>5</sup> células/mL
cepa viral	17D-213/77 17DD	17D-213/77
diluição viral	10 <sup>-1</sup> a 10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4,26</sup>
tempo neutralização	1 hora 1 hora e 30 minutos 2 horas	2 horas
concentração do meio semissólido	0,5% 1,0% 1,5% 2,0% 2,5%	2,0%
tempo (pós-infecção) para revelação do teste	24 horas 36 horas 48 horas 72 horas 96 horas	48 horas
solução fixadora	formaldeído etanol:metanol	etanol:metanol
anticorpo monoclonal conjugado (HRP)	2D12 4G2	4G2
diluição do anticorpo monoclonal conjugado	1:500 1:1000 1:1500 1:2000 1:3000	1:3000

A partir da definição do protocolo de execução do  $\mu$ PRN-HRP de FA (figura 4.28), foi possível realizar os ensaios de calibração dos soros controles (seção 4.3.2), validação (seção 4.3.3) e avaliação comparativa com o teste referência (seção 4.4).



**Figura 4.28: Esquema do protocolo de execução do  $\mu$ PRN-HRP de FA.**

Etapas do  $\mu$ PRN-HRP de FA resultante do processo de padronização da metodologia. Tempo total do teste: 4 dias.

#### 4.3.2 Calibração dos Soros Padrões

O processamento das 30 replicatas do soro padrão positivo P3 gerou, em recíproca da diluição, o TMG de 595. Considerando a variação de 3 vezes, títulos entre 198 e 1784 poderiam ser aceitos nos ensaios de  $\mu$ PRN-HRP. O valor nominal obtido foi de 12.811 mUI/mL. Este valor foi utilizado para a transformação, em mUI/mL, dos títulos obtidos pela metodologia do  $\mu$ PRN-HRP de soros processados neste estudo.

O TMG, em recíproca da diluição, dos 30 resultados do soro P1/100 foi de 3,2, podendo variar até 9,7.

### **4.3.3 Validação do Teste**

#### **Precisão (ou confiabilidade)**

Para a avaliação da precisão, 16 soros com diferentes níveis de anticorpos neutralizantes foram selecionados para serem processados, por dois operadores, em 3 ensaios independentes da metodologia do  $\mu$ PRN-HRP. Os TMGs obtidos e as faixas de variação dos soros ( $\pm 3$  vezes o TMG ou  $\pm 0,48$ .  $\text{Log}_{10} 3 = 0,477$ ) foram determinados para a avaliação da precisão intraensaio (quadro 4.15).

Os dados mostraram que os critérios preestabelecidos – 90% (5 de 6) dos títulos das replicatas do soro não deveriam variar mais que 3 vezes o valor de seu TMG e que, pelo menos, 80% (13) dos 16 soros avaliados deveriam ter atingido esse critério – foram alcançados em 100% dos resultados.

A precisão interensaio do  $\mu$ PRN-HRP foi avaliada a partir das 12 replicatas dos soros processados pelo mesmo operador em dois ensaios independentes (quadro 4.16), mas também a partir dos 18 resultados obtidos para cada um dos 16 soros resultantes de 3 ensaios, variando o operador (quadro 4.17).

A precisão interensaio do  $\mu$ PRN-HRP também apresentou resultados satisfatórios. Todos os 16 soros avaliados atingiram o critério preestabelecido em que, no mínimo, 90% dos resultados obtidos para um soro (11 de 12 ou 16 de 18) deveriam estar dentro da faixa de variação ( $\pm 0,48$ ) do TMG.

**Quadro 4.15:** Dados de avaliação da precisão intraensaio do  $\mu$ PRN-HRP de FA.

SORO	ENSAIO 1 (OPERADOR 1)			ENSAIO 2 (OPERADOR 2)			ENSAIO 3 (OPERADOR 1)		
	TMG ( $\pm 0,48$ )*	títulos fora da variação	CV (%)	TMG ( $\pm 0,48$ )*	títulos fora da variação	CV (%)	TMG ( $\pm 0,48$ )*	títulos fora da variação	CV (%)
SIH202	3,16 (2,68; 3,64)	0	1	3,16 (2,68; 3,64)	0	0	3,07 (2,59; 3,55)	0	3
SIH228	3,12 (2,64; 3,60)	0	2	3,16 (2,68; 3,64)	0	0	2,97 (2,49; 3,45)	0	3
SIH017	3,15 (2,67; 3,63)	0	1	3,15 (2,67; 3,63)	0	1	3,11 (2,63; 3,59)	0	2
SIH271	3,16 (2,68; 3,64)	0	0	3,16 (2,68; 3,64)	0	0	3,16 (2,68; 3,64)	0	0
SIH250	3,09 (2,61; 3,57)	0	3	2,90 (2,42; 3,38)	0	2	2,80 (2,32; 3,28)	0	5
SIH008	3,05 (2,57; 3,53)	0	4	2,91 (2,43; 3,39)	0	5	2,88 (2,40; 3,36)	0	9
SIH269	3,09 (2,61; 3,57)	0	4	2,98 (2,50; 3,46)	0	5	2,95 (2,47; 3,43)	0	2
SIH071	2,81 (2,33; 3,29)	0	4	3,01 (2,53; 3,49)	0	2	2,78 (2,30; 3,26)	0	4
SIH172	3,03 (2,55; 3,51)	0	2	3,12 (2,64; 3,60)	0	2	3,01 (2,53; 3,49)	0	3
SIH068	3,07 (2,59; 3,55)	0	3	3,05 (2,57; 3,53)	0	3	2,85 (2,37; 3,33)	0	6
SIH256	2,12 (1,64; 2,60)	0	1	2,16 (1,68; 2,64)	0	4	2,06 (1,58; 2,54)	0	11
SIH129	2,64 (2,16; 3,12)	0	9	2,57 (2,09; 3,05)	0	4	2,29 (1,81; 2,77)	0	5
SIH232	2,99 (2,51; 3,47)	0	5	2,92 (2,44; 3,40)	0	2	2,76 (2,28; 3,24)	0	4
SIH139	2,72 (2,24; 3,20)	0	6	2,72 (2,24; 3,20)	0	7	2,51 (2,03; 2,99)	0	3
SIH144	2,42 (1,94; 2,90)	0	6	2,43 (1,95; 2,91)	0	6	2,20 (1,72; 2,68)	0	7
SIH268	2,73 (2,25; 3,21)	0	2	2,67 (2,19; 3,15)	0	4	2,78 (2,30; 3,26)	0	5

\* TMG ( $\text{Log}_{10}$  da recíproca da diluição) calculado a partir dos títulos obtidos das 6 replicatas do soro no mesmo ensaio.  $\text{Log}_{10} 3 = 0,48$ .

**Quadro 4.16:** Dados de avaliação da precisão interensaio do  $\mu$ PRN-HRP de FA: mesmo operador, ensaios diferentes.

SORO	ENSAIOS 1 e 3 (OPERADOR 1)		
	TMG ( $\pm 0,48$ )*	títulos fora da variação	CV (%)
SIH202	3,12 (2,64; 3,60)	0	3
SIH228	3,04 (2,56; 3,52)	0	4
SIH017	3,13 (2,65; 3,61)	0	2
SIH271	3,13 (2,68; 3,64)	0	0
SIH250	2,94 (2,46; 3,42)	0	7
SIH008	2,96 (2,48; 3,44)	0	7
SIH269	3,02 (2,54; 3,50)	0	4
SIH071	2,80 (2,32; 3,28)	0	4
SIH172	3,02 (2,54; 3,50)	0	2
SIH068	2,96 (2,48; 3,44)	0	6
SIH256	2,09 (1,61; 2,57)	0	7
SIH129	2,46 (1,98; 2,94)	0	10
SIH232	2,87 (2,39; 3,35)	0	6
SIH139	2,61 (2,13; 3,09)	0	6
SIH144	2,31 (1,83; 2,79)	0	8
SIH268	2,76 (2,28; 3,24)	0	4

\* TMG ( $\text{Log}_{10}$  da recíproca da diluição) calculado a partir dos 12 títulos obtidos do soro em 2 ensaios independentes.  $\text{Log}_{10} 3 = 0,48$ .

**Quadro 4.17:** Dados de avaliação da precisão interensaio do  $\mu$ PRN-HRP de FA: operadores diferentes, ensaios diferentes.

SORO	ENSAIOS 1, 2 e 3 (OPERADORES 1 e 2)		
	TMG ( $\pm 0,48$ ) <sup>*</sup>	títulos fora da variação	CV (%)
SIH202	3,13 (2,65; 3,61)	0	2
SIH228	3,08 (2,60; 3,56)	0	4
SIH017	3,14 (2,66; 3,62)	0	2
SIH271	3,16 (2,68; 3,64)	0	0
SIH250	2,93 (2,45; 3,41)	0	6
SIH008	2,94 (2,46; 3,42)	0	6
SIH269	3,01 (2,53; 3,49)	0	4
SIH071	2,86 (2,38; 3,34)	0	5
SIH172	3,05 (2,57; 3,53)	0	3
SIH068	2,99 (2,51; 3,47)	0	5
SIH256	2,12 (1,64; 2,60)	0	6
SIH129	2,50 (2,02; 2,98)	0	9
SIH232	2,89 (2,41; 3,37)	0	5
SIH139	2,65 (2,17; 3,13)	0	7
SIH144	2,35 (1,87; 2,83)	0	8
SIH268	2,73 (2,25; 3,21)	0	4

<sup>\*</sup> TMG ( $\text{Log}_{10}$  da recíproca da diluição) calculado a partir dos 18 títulos obtidos do soro em 3 ensaios independentes.  $\text{Log}_{10} 3 = 0,48$ .

### **Exatidão (ou taxa de diluição)**

Os dados de 14 amostras com níveis diferentes de anticorpos neutralizantes, resultantes da diluição em soro negativo de 4 soros positivos para FA, foram utilizados para a avaliação de exatidão do  $\mu$ PRN-HRP (quadro 4.18).

O critério preestabelecido foi atingido para evidenciar a exatidão do teste. Todas as diferenças absolutas determinadas para as apresentações diluídas dos 4 soros avaliados foram menores que 0,477.

### **Seletividade (ou especificidade)**

Soros com títulos de anticorpos neutralizantes para FA misturados a soros com anticorpos para dengue foram processados, em um único ensaio, para a avaliação da seletividade do  $\mu$ PRN-HRP. Tomando como diluição referência a mistura dos soros positivos para FA com o soro padrão negativo (P1/100), foi determinada a diferença absoluta entre os títulos obtidos (quadro 4.19).

A seletividade do  $\mu$ PRN-HRP de FA foi comprovada, pois todas as diferenças absolutas observadas entre os TMGs das misturas referência (soros FA+/DEN- com soro FA-) e os das misturas teste (soros FA+/DEN- com DEN+) foram menores que 0,477.

**Quadro 4.18:** Dados de avaliação da exatidão do  $\mu$ PRN-HRP de FA.

SORO	DILUIÇÃO*	TMG OBSERVADO** (Log <sub>10</sub> )	TMG ESPERADO*** (Log <sub>10</sub> )	DIFERENÇA ABSOLUTA****
P3	Não diluído	3,037	NA	NA
	1:2	2,647	2,736	0,089
	1:4	2,334	2,435	0,101
	1:8	2,020	2,134	0,114
	1:16	1,663	1,833	0,170
	1:32	1,439	1,532	0,093
SIH020	Não diluído	3,156	NA	NA
	1:4	2,882	2,554	0,327
	1:8	2,414	2,253	0,160
	1:16	2,162	1,952	0,210
SIH128	Não diluído	3,050	NA	NA
	1:4	2,331	2,448	0,118
	1:8	2,062	2,147	0,085
	1:16	1,787	1,846	0,059
SIH167	Não diluído	2,740	NA	NA
	1:4	2,198	2,138	0,060
	1:8	1,962	1,837	0,125
	1:16	1,597	1,536	0,061

\* diluição prévia do soro íntegro (P3, SIH020, SIH128 e SIH167) no soro padrão interno negativo (P1/100).

\*\* TMG (em recíproca da diluição) calculado a partir de 5 replicatas de cada soro.

\*\*\* TMG (em recíproca da diluição) observado para o soro não diluído subtraído pelo fator de diluição. Fatores de diluição em Log<sub>10</sub>: 2 = 0,301; 4 = 0,602; 8 = 0,903; 16 = 1,204; 32 = 1,505.

\*\*\*\* Diferença absoluta entre os TMGs observado e esperado.

NA = não se aplica.

**Quadro 4.19:** Dados de avaliação da seletividade do  $\mu$ PRN-HRP de FA.

SORO (FA+/DEN-)	AMOSTRA DILUIDORA*	TMG OBSERVADO** (Log <sub>10</sub> )	DIFERENÇA ABSOLUTA***
SIH179	P1/100 (FA-)	2,733	NA
	SIH117 (DEN+)	2,639	0,094
	SIH183 (DEN+)	2,693	0,040
	SIH208 (DEN+)	2,714	0,019
SIH261	P1/100 (FA-)	2,367	NA
	SIH117 (DEN+)	2,595	0,229
	SIH183 (DEN+)	2,575	0,209
	SIH208 (DEN+)	2,632	0,265
SIH282	P1/100 (FA-)	3,020	NA
	SIH117 (DEN+)	3,102	0,082
	SIH183 (DEN+)	3,069	0,048
	SIH208 (DEN+)	3,051	0,031
SIH285	P1/100 (FA-)	2,531	NA
	SIH117 (DEN+)	2,604	0,074
	SIH183 (DEN+)	2,674	0,143
	SIH208 (DEN+)	2,614	0,083
SIH289	P1/100 (FA-)	2,665	NA
	SIH117 (DEN+)	2,748	0,083
	SIH183 (DEN+)	2,723	0,057
	SIH208 (DEN+)	2,838	0,173

\* soro padrão interno negativo para anticorpos de FA (FA-) ou soro amostral com anticorpos para 1 ou mais sorotipos do vírus da dengue (DEN+) utilizado para diluir (proporção 1:1) soro positivo para FA e negativo para dengue (FA+/DEN-).

\*\* TMG (em recíproca da diluição) calculado a partir de 3 replicatas de cada amostra (mistura de soros).

\*\*\* Diferença absoluta entre os TMGs obtidos para a mistura referência (soro FA+/DEN- com P1/100) e a mistura teste (soro FA+/DEN- com soro DEN+).

NA = não se aplica.

## **Robustez**

Os títulos de anticorpos de 6 soros amostrais submetidos a pequenos e comuns desvios de diferentes variáveis do protocolo de execução do  $\mu$ PRN-HRP foram comparados aos títulos obtidos da condição padrão respectiva para a avaliação da robustez do teste (quadro 4.20).

Na avaliação da variável “densidade celular”, um soro (SIH146) submetido à condição de  $1,0 \times 10^5$  células/mL (desvio 2), apresentou título com diferença absoluta maior que 0,477 quando comparado ao título do mesmo soro submetido à condição padrão ( $2,0 \times 10^5$  células/mL). Porém, o critério estabelecido para robustez foi atingido, onde 5 dos 6 soros avaliados para uma determinada variável deveriam apresentar diferença absoluta entre os títulos menor que 0,477.

Mas, na avaliação da variável “tempo anticorpo conjugado”, observou-se que dois (SIH199 e SIH146) dos seis soros submetidos à condição 2 (1 hora e 40 minutos de incubação) apresentaram títulos com diferença absoluta para os títulos obtidos na condição padrão (2 horas) maiores que 0,477. Esse dado sugere a falha de robustez do  $\mu$ PRN-HRP considerando essa variável e a importância de seguir o tempo estabelecido de incubação do anticorpo conjugado na execução do teste.

Não houve diferença absoluta maior que 0,477 na comparação entre os títulos obtidos nas condições padrão e desvios para as demais variáveis avaliadas.

## **4.4 Avaliação Comparativa**

A concordância dos títulos de anticorpos neutralizantes para FA de 200 soros submetidos às metodologias dos testes índices e o teste referência foi avaliada a partir do CCI para os resultados em recíproca da diluição (quadro 4.21) e em mUI/mL (quadro 4.22).

O CCI para concordância completa da comparação PRNT X micro PRNT apresentou magnitude moderada (medida única) a substancial (CCI da média) considerando os títulos obtidos em recíproca da diluição e em mUI/mL, apesar destes terem apresentado CCI mais baixo.

**Quadro 4.20:** Dados de avaliação da robustez do  $\mu$ PRN-HRP de FA.

VARIÁVEL	SORO	TÍTULO* (Log <sub>10</sub> ) CONDIÇÃO PADRÃO	TÍTULO* (Log <sub>10</sub> ) CONDIÇÃO DESVIO 1	TÍTULO* (Log <sub>10</sub> ) CONDIÇÃO DESVIO 2	DIFERENÇA ABSOLUTA DESVIO 1**	DIFERENÇA ABSOLUTA DESVIO 2**
concentração viral	SIH207	3,107	3,159	3,001	0,052	0,107
	SIH014	2,658	2,766	2,858	0,108	0,200
	SIH145	2,398	2,300	2,207	0,098	0,191
	SIH252	2,818	2,958	2,663	0,140	0,155
	SIH199	2,182	2,503	2,415	0,321	0,233
	SIH146	2,652	3,123	2,623	0,471	0,029
tempo neutralização	SIH207	3,076	3,145	3,067	0,070	0,009
	SIH014	2,701	2,929	2,670	0,228	0,030
	SIH145	2,289	2,374	2,152	0,086	0,137
	SIH252	2,537	2,861	2,634	0,324	0,097
	SIH199	2,431	2,437	2,228	0,006	0,203
	SIH146	2,491	2,799	2,600	0,308	0,109
densidade celular	SIH207	3,164	3,061	2,687	0,103	0,477
	SIH014	2,994	2,675	3,164	0,319	0,170
	SIH145	2,590	2,715	2,210	0,125	0,380
	SIH252	2,926	2,946	2,465	0,020	0,461
	SIH199	2,450	2,717	2,033	0,266	0,417
	SIH146	3,054	2,733	2,552	0,321	0,502 <sup>‡</sup>
tempo adsorção	SIH207	3,164	3,171	3,164	0,007	0,000
	SIH014	2,967	2,923	2,843	0,044	0,124
	SIH145	2,181	2,442	2,529	0,261	0,347
	SIH252	2,784	2,763	2,595	0,021	0,188
	SIH199	2,241	2,417	2,125	0,177	0,115
	SIH146	2,762	2,700	2,709	0,063	0,054
diluição anticorpo conjugado	SIH207	3,083	3,176	3,164	0,093	0,081
	SIH014	2,778	2,933	3,045	0,156	0,267
	SIH145	2,558	2,162	2,663	0,397	0,104
	SIH252	2,711	2,880	2,868	0,170	0,158
	SIH199	2,896	2,511	2,615	0,385	0,280
	SIH146	2,640	3,113	2,634	0,473	0,006
tempo anticorpo conjugado	SIH207	3,164	3,164	3,164	0,000	0,000
	SIH014	2,687	3,027	2,994	0,341	0,307
	SIH145	2,511	2,453	2,494	0,058	0,016
	SIH252	3,055	2,788	2,624	0,267	0,430
	SIH199	2,687	2,539	2,206	0,147	0,481 <sup>‡</sup>
	SIH146	3,164	3,032	2,654	0,132	0,510 <sup>‡</sup>

\* título de anticorpos neutralizantes para FA em recíproca da diluição.

\*\* Diferença absoluta entre os títulos de anticorpos obtidos na condição padrão e na condição desvio (1 ou 2) de variável do protocolo de execução do  $\mu$ PRN-HRP.

<sup>‡</sup> resultados com diferença absoluta > 0,477 (log<sub>10</sub> 3).

A avaliação comparativa PRNT X  $\mu$ PRN-HRP dos títulos de anticorpos em recíproca da diluição resultou em concordância fraca (medida única) a moderada (média de duas medidas). Em contrapartida, quando a comparação foi realizada considerando os títulos transformados em mUI/mL, os estimadores de concordância apresentaram magnitude substancial a quase completa, superiores aos demais CCI obtidos.

**Quadro 4.21:** CCI determinado a partir dos títulos de anticorpos neutralizantes ( $\log_{10}$  recíproca da diluição) de 200 soros para a análise de concordância entre o PRNT, micro PRNT e  $\mu$ PRN-HRP de FA. IC<sub>95%</sub> = Intervalo de confiança de 95%. SPSS V.17.0.

Teste Referência X Teste Índice	CCI (IC <sub>95%</sub> )	CCI da Média (IC <sub>95%</sub> )	Significância (p-valor)
PRNT X micro PRNT	0,59 (0,49-0,68)	0,74 (0,66-0,81)	0,000
PRNT X $\mu$ PRN-HRP	0,29 (0,16-0,41)	0,45 (0,27-0,58)	0,000

**Quadro 4.22:** CCI determinado a partir dos títulos de anticorpos neutralizantes ( $\log_{10}$  mUI/mL) de 200 soros para a análise de concordância entre o PRNT, micro PRNT e  $\mu$ PRN-HRP de FA. IC<sub>95%</sub> = Intervalo de confiança de 95%. SPSS V.17.0.

Teste Referência X Teste Índice	CCI (IC <sub>95%</sub> )	CCI da Média (IC <sub>95%</sub> )	Significância (p-valor)
PRNT X micro PRNT	0,48 (0,37-0,58)	0,65 (0,54-0,74)	0,000
PRNT X $\mu$ PRN-HRP	0,69 (0,61-0,76)	0,82 (0,76-0,87)	0,000

A comparação entre os títulos de anticorpos em mUI/mL obtidos nos três testes foi possível a partir da determinação dos valores nominais do soro padrão positivo nos testes índices (apresentados nas seções 4.2.2 e 4.3.2) e no teste referência. As 30 replicatas do P3 processadas no PRNT resultou no TMG de 18.180 mUI/mL.

Coeficientes de correlação linear também foram determinados para as comparações PRNT X micro PRNT e PRNT X  $\mu$ PRN-HRP (quadros 4.23 e 4.24), assim como gráficos de dispersão para os títulos em recíproca da diluição (figura 4.29) e em mUI/mL (figura 4.30) dos 200 soros.

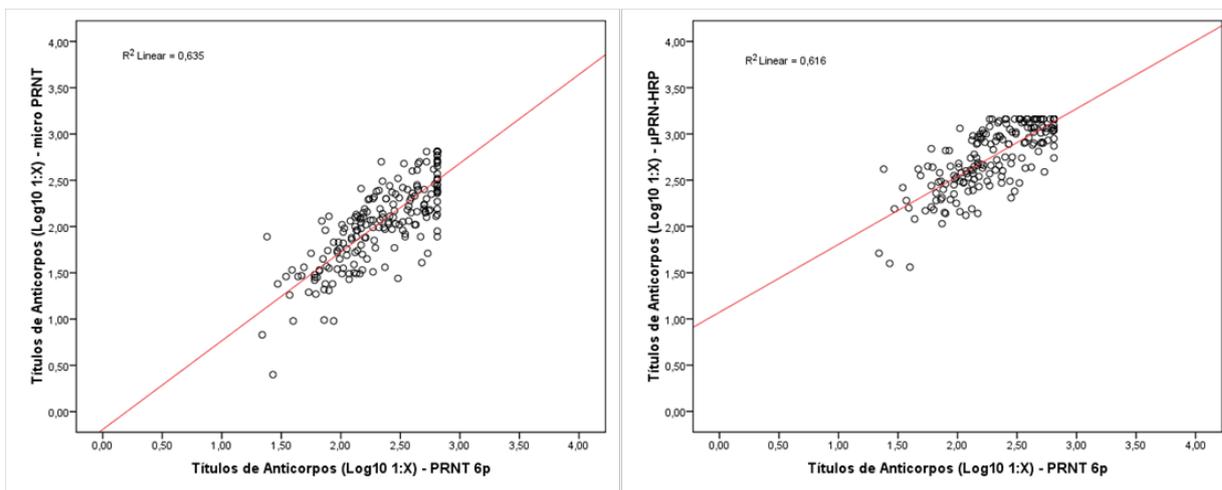
Os dados obtidos foram muito próximos e apresentaram correlação satisfatória ( $r > 0,70$ ) entre os testes índices e o teste referência. A análise dos gráficos de dispersão indicou concordância levemente superior do micro PRNT comparado ao  $\mu$ PRN-HRP, pois apresentou linhas de tendência com perfis de inclinação mais próximos de 45°.

**Quadro 4.23:** Coeficientes de correlação de Pearson ( $r$ ) dos resultados obtidos ( $\log_{10}$  recíproca da diluição) dos 200 soros submetidos ao PRNT, micro PRNT e  $\mu$ PRN-HRP de FA. SPSS V.17.0.

Variável Preditora	Variável Dependente	$r$	Significância (p-valor)
PRNT	micro PRNT	0,80	0,000
	$\mu$ PRN-HRP	0,79	0,000

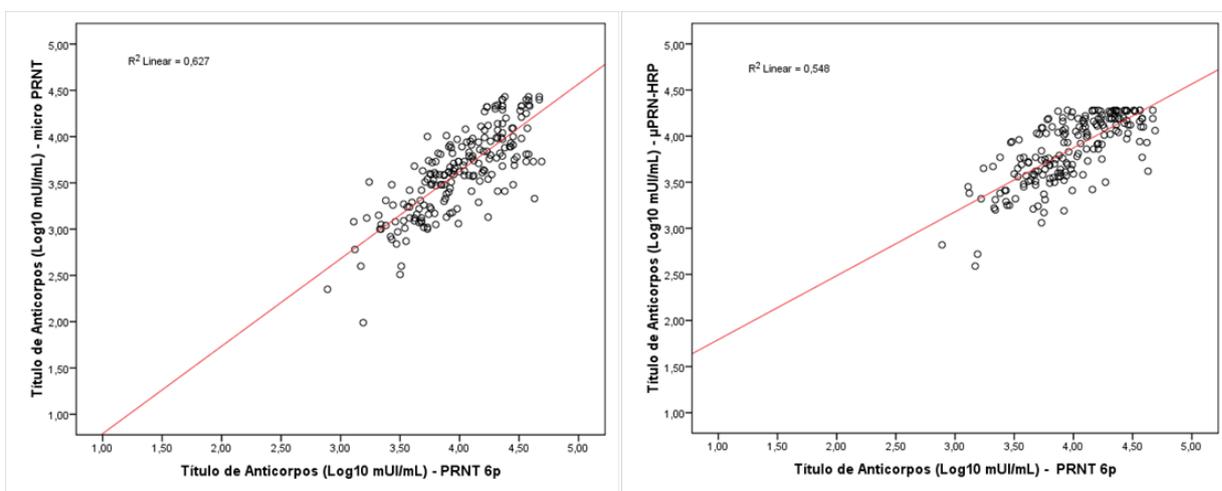
**Quadro 4.24:** Coeficientes de correlação de Pearson ( $r$ ) dos resultados obtidos ( $\log_{10}$  mUI/mL) dos 200 soros submetidos ao PRNT, micro PRNT e  $\mu$ PRN-HRP de FA. SPSS V.17.0.

Variável Preditora	Variável Dependente	$r$	Significância (p-valor)
PRNT	micro PRNT	0,79	0,000
	$\mu$ PRN-HRP	0,74	0,000



**Figura 4.29: Gráficos de dispersão dos títulos de anticorpos neutralizantes para FA em recíproca da diluição.**

Eixo X: títulos determinados pelo teste referência (PRNT). Eixo Y: títulos determinados pelos testes índices (micro PRNT à esquerda;  $\mu$ PRN-HRP à direita). Linha tendência em vermelho. n = 200. SPSS V.17.0.



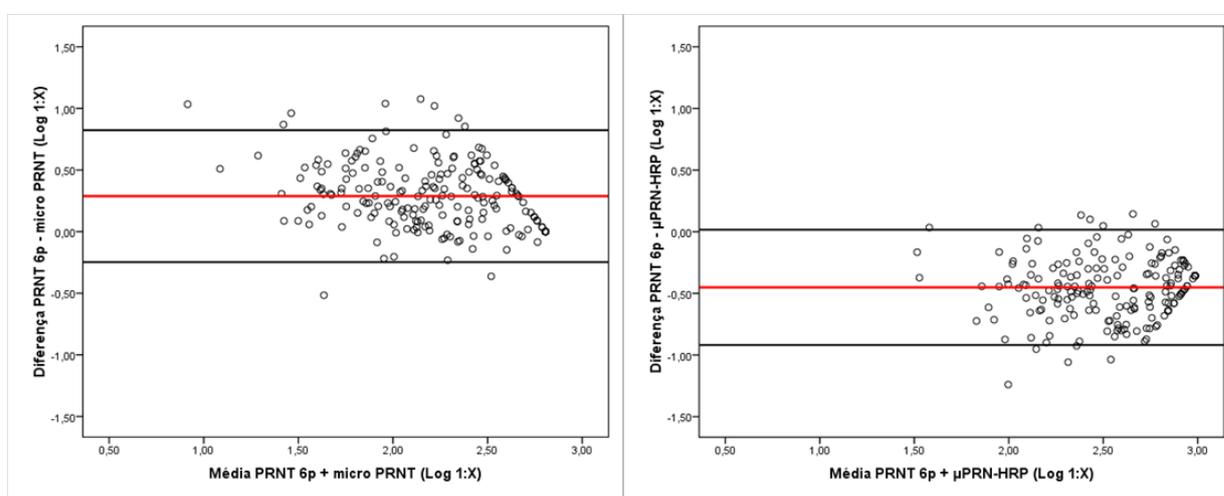
**Figura 4.30: Gráficos de dispersão dos títulos de anticorpos neutralizantes para FA em mUI/mL.**

Eixo X: títulos determinados pelo teste referência (PRNT). Eixo Y: títulos determinados pelos testes índices (micro PRNT à esquerda;  $\mu$ PRN-HRP à direita). Linha tendência em vermelho. n = 200. SPSS V.17.0.

Complementando a análise da concordância, diagramas de Bland-Altman foram projetados a partir dos títulos em recíproca da diluição (figura 4.31) e em mUI/mL (figura 4.32) dos 200 soros processados pelos três testes de neutralização.

A análise dos diagramas obtidos mostrou que títulos em recíproca da diluição e em mUI/mL gerados pelo PRNT foram sistematicamente superiores ao micro PRNT. As diferenças não mostraram correlação com as médias dos títulos.

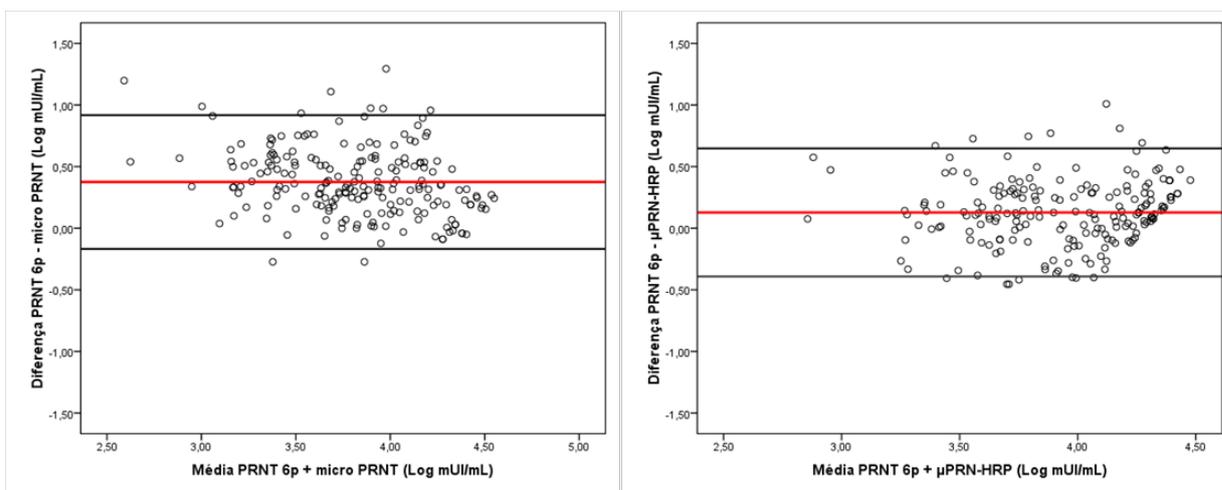
Diferentemente, títulos em recíproca da diluição gerados pelo  $\mu$ PRN-HRP foram maiores do que os do PRNT, mas as diferenças nas recíprocas dos títulos também não pareceram correlacionadas com as médias dos títulos. As diferenças dos títulos em mUI/mL medidos pelo  $\mu$ PRN-HRP e pelo PRNT foram mais sutis e não se correlacionaram com as médias dos títulos segundo os dois métodos.



**Figura 4.31: Diagramas de Bland-Altman dos títulos de anticorpos neutralizantes para FA em recíproca da diluição.**

Eixo X: média dos títulos determinados pelo teste referência (PRNT) e índices (micro PRNT à esquerda;  $\mu$ PRN-HRP à direita). Eixo Y: diferenças entre os títulos determinados pelo teste referência (PRNT) e índices (micro PRNT à esquerda;  $\mu$ PRN-HRP à direita). Linha vermelha: média das diferenças das medidas. Linhas pretas: intervalo (95%) das distribuições das diferenças das medidas. n = 200. SPSS V.17.0.

A estatística descritiva dos dados (quadro 4.25) permitiu avaliar os perfis de tendência e dispersão dos títulos obtidos para os diferentes testes de neutralização. Essas análises também foram representadas graficamente (figura 4.33).



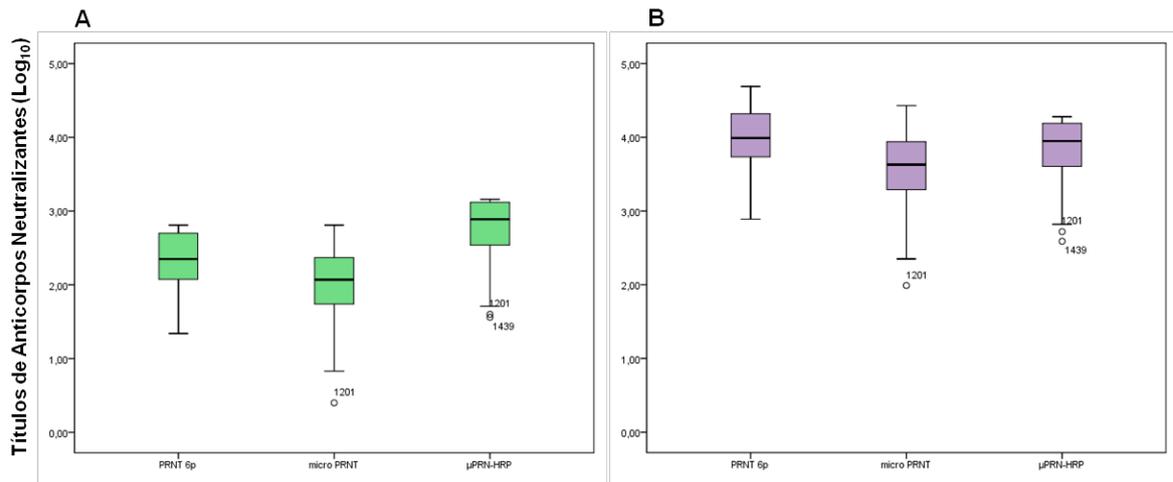
**Figura 4.32: Diagramas de Bland-Altman dos títulos de anticorpos neutralizantes para FA em mUI/mL.**

Eixo X: média dos títulos determinados pelo teste referência (PRNT) e índices (micro PRNT à esquerda;  $\mu$ PRN-HRP à direita). Eixo Y: diferenças entre os títulos determinados pelo teste referência (PRNT) e índices (micro PRNT à esquerda;  $\mu$ PRN-HRP à direita). Linha vermelha: média das diferenças das medidas. Linhas pretas: intervalo (95%) das distribuições das diferenças das medidas.  $n = 200$ . SPSS V.17.0.

Os valores obtidos para a média e mediana foram compatíveis com a tendência evidenciada nos diagramas de dispersão e de Bland-Altman. Títulos expressos em recíproca da diluição gerados pelo  $\mu$ PRN-HRP são mais altos quando comparados ao teste referência. No entanto, a transformação dos títulos em mUI/mL resultou em tendência similar a dos títulos obtidos para o PRNT e o micro PRNT.

**Quadro 4.25: Estatística descritiva dos 200 soros submetidos ao PRNT, micro PRNT e  $\mu$ PRN-HRP de FA. SPSS V.17.0.**

Medidas	PRNT		Micro PRNT		$\mu$ PRN-HRP	
	Log <sub>10</sub> 1:X	Log <sub>10</sub> mUI/mL	Log <sub>10</sub> 1:X	Log <sub>10</sub> mUI/mL	Log <sub>10</sub> 1:X	Log <sub>10</sub> mUI/mL
média	2,34	4,00	2,05	3,62	2,79	3,87
mediana	2,35	4,00	2,07	3,63	2,89	3,95
desvio padrão	0,38	0,38	0,45	0,45	0,35	0,35
variância	0,14	0,14	0,20	0,20	0,12	0,13



**Figura 4.33: Mediana, percentis 25 e 75 dos títulos de anticorpos neutralizantes dos 200 soros processados pelos três testes de neutralização.**

Eixo X: testes de neutralização – PRNT (6 poços), micro PRNT e μPRN-HRP. Eixo Y: títulos de anticorpos neutralizantes em **(A)** recíproca da diluição e **(B)** em mUI/mL. SPSS V.17.0.

## 5 DISCUSSÃO

A metodologia clássica do PRNT (ou suas variações) é profusamente utilizada em estudos de avaliação da imunogenicidade das vacinas para FA<sup>212,215,260,261,284,294,295</sup>, considerada referência para esta finalidade e para a diferenciação sorológica de infecções por *Flavivirus*. No entanto, observa-se uma falta de uniformização da metodologia utilizada entre os diferentes laboratórios de pesquisa e de desenvolvimento de vacinas<sup>227</sup>.

Diferenças metodológicas, como linhagens celulares, fator de diluição, composição do meio semissólido, técnicas de visualização e leitura das placas de lise, porcentagem de redução viral (“end-point”), cálculo dos títulos, entre outras, impactam diretamente na sensibilidade do teste (refletida pelo TMG obtido). Consequentemente, as diferenças metodológicas são obstáculos na comparação de títulos de anticorpos entre laboratórios ou estudos clínicos, mas também para definir um valor como o verdadeiro correlato sorológico de proteção<sup>227</sup>.

Embora a metodologia clássica do PRNT não tenha sido validada pela maioria dos laboratórios, o teste está em uso há muito tempo e é amplamente aceito como padrão referência<sup>264</sup>. Por isso, a importância em determinar como os resultados obtidos dos dois testes índices abordados nesse estudo concordavam com os gerados por PRNT.

A otimização, a padronização/desenvolvimento e a validação bem-sucedidos de um teste de neutralização são fatores-chave para o fornecimento de dados acurados e confiáveis, cruciais em estudos epidemiológicos e com vacinas e para garantir a reprodutibilidade do teste durante longos períodos<sup>268,293</sup>.

A produção de um novo banco de trabalho da cepa vacinal 17D-213/77, previamente submetido à passagem em células Vero e coletado no momento apropriado da fase exponencial de crescimento, resultou em preparação viral com título alto e perfil de PFU satisfatório (com tamanho e morfologia esperados).

Bancos de vírus de RNA costumam apresentar misturas divergentes de partículas infecciosas e defectivas. Estas contêm um genoma defeituoso (incompleto), especialmente em relação aos genes de replicação. Além disso, as partículas defectivas dependem da cepa selvagem para serem produzidas, reduzindo as fontes requeridas para a produção de virions infecciosos<sup>296,297</sup>.

Estudos já demonstraram o efeito da presença dessas partículas em preparações virais. A quantidade relativa de partículas defectivas foi, pelo menos, 5 vezes maior no banco com o título mais baixo comparado ao banco com o maior título viral; e vírus submetidos a processo de purificação aumentaram seus títulos em 10 a 1000 vezes<sup>296,297</sup>.

A relação entre os dois tipos de partículas pode variar expressivamente e a extensão dessa variação depende basicamente do número de passagens e da MOI<sup>298,299</sup>. A importância da detecção e remoção dessas partículas incompletas em um banco de vírus destinado aos ensaios de neutralização é justificada pelo fato das superfícies de partículas infecciosas e defectivas compartilharem a mesma imunorreatividade, competindo pela reação com os anticorpos e, portanto, podendo subestimar os resultados em títulos de anticorpos neutralizantes.

Handke e colaboradores<sup>297</sup> demonstraram que bancos virais com níveis mais baixos de partículas defectivas resultaram em títulos de anticorpos mais altos em comparação com a análise realizada de estoques virais contendo níveis mais altos de partículas defectivas.

O banco de trabalho da cepa 17D-213/77 obtido de acordo com a análise da sua curva de crescimento e apresentando alto título sugerem a ausência ou a baixa quantidade de partículas defectivas. Estudos para determinar a presença dessas partículas nessa preparação viral poderão contribuir para a melhora do desempenho dos testes de neutralização na determinação dos anticorpos neutralizantes.

O melhor perfil de PFU da cepa 17D-213/77 comparado à cepa 17DD, observado durante a padronização do  $\mu$ PRN-HRP, também foi constatado para a metodologia do micro PRNT (dados não mostrados).

Apesar da vacina administrada no Brasil ser produzida com a cepa 17DD e, portanto, os estudos clínicos incluírem participantes vacinados com esta cepa, não afeta substancialmente os dados obtidos a partir de testes de neutralização com a cepa vacinal 17D-213/77. Há estreita relação antigênica entre estas cepas, onde ambas estimulam proteção contra todos os genótipos do vírus da FA<sup>187</sup>.

A quantidade de vírus desafio e o número de replicatas (do soro ou do vírus) são fundamentais para a obtenção de medidas acuradas. A quantidade de vírus aplicada ao teste deve ser modificada de acordo com a área superficial da monocamada celular para a obtenção de placas de lise discerníveis, minimizando o excesso e a sobreposição (aglomeração) delas<sup>227</sup>.

A análise qualitativa (visual) das diferentes diluições virais foi a base para a determinação das quantidades de placas de lise obtidas por poço para os testes aplicados em microplacas.

Para o micro PRNT, a obtenção de 30 placas de lise por poço já havia sido definida como a ideal para o controle de vírus, de acordo com a experiência do laboratório. Mas os diversos ensaios realizados no presente estudo, em que o teste foi desafiado com diferentes quantidades de vírus, apontaram a dificuldade da contagem superior a 60 placas de lise em um poço com menos de 1 cm<sup>2</sup> de área.

Em relação ao  $\mu$ PRN-HRP, a experiência do grupo da GSK na padronização da metodologia para os sorotipos do vírus da dengue indicava a quantidade média ideal em torno de 75 PFU/poço no controle viral. Esta quantidade também foi adequada para PFU de FA e serviu de base para os ensaios de padronização do teste e a determinação da diluição viral ideal.

Os dados obtidos de todos os ensaios realizados apresentaram variação de 40 a 120 PFU/poço. Mais ensaios serão necessários para determinar a faixa de aceitação para a quantidade de PFU/poço no controle viral do  $\mu$ PRN-HRP, incluindo o processamento de soros com diferentes níveis de anticorpos neutralizantes (assim como foi realizado na otimização do micro PRNT).

No entanto, os ensaios de validação do  $\mu$ PRN-HRP sugeriram o êxito da faixa de 40-120 PFU/poço, pois todos os critérios predefinidos para a validação foram alcançados a partir de ensaios que apresentaram essa faixa de PFU/poço nos controles de vírus.

A qualidade da monocamada celular é crítica para o desenvolvimento das placas de lise e, portanto, para gerar resultados acurados<sup>227</sup>. A produção de um novo banco de células Vero foi fundamental para o sucesso da padronização do  $\mu$ PRN-HRP. A melhora considerável da monocamada de células foi evidenciada pela visualização do perfil mais homogêneo e a diminuição dos grumos.

Mas a importância da qualidade da célula também pode explicar a menor quantidade de placas de lise observada para o ensaio 1 comparado aos 3 outros ensaios, na avaliação das variáveis em diferentes tempos de neutralização no processo de otimização do micro PRNT.

A acurácia e a precisão do micro PRNT, metodologia utilizada na rotina do Latev, já haviam sido avaliadas com a determinação dos parâmetros de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, apresentando resultados bastante satisfatórios<sup>286</sup>.

A otimização do micro PRNT no presente estudo objetivou a definição de uma faixa de aceitação para a quantidade de placas de lise por poço da cepa 17D-213/77, significando a determinação de um critério de aceitação/exclusão do teste. A definição dessa faixa tem um impacto direto na precisão dos resultados. As quantidades mínima e máxima de placas de lise por poço foram determinadas de acordo com o tempo de neutralização e a diluição do vírus ideais; isto é, aqueles que resultavam em menores variações observadas no controle viral, mas também nos títulos de anticorpos neutralizantes.

Ademais, a calibração dos soros padrões internos, em que se estabeleceu os seus respectivos títulos mínimo e máximo em recíproca da diluição, além do valor nominal (em mUI/mL) para o padrão positivo, foi em conformidade com a faixa viral proposta.

Deste modo, ensaios de micro PRNT que não alcancem os critérios de aceitação estabelecidos para os controles de vírus e soros padrões internos (positivo e negativo) passam a não ser aceitos, gerando resultados mais confiáveis.

A padronização do  $\mu$ PRN-HRP de FA veio ao encontro da demanda crescente de estudos clínicos de avaliação da resposta imune vacinal, apresentando como vantagens a celeridade na determinação dos anticorpos neutralizantes e com maior capacidade de processamento de amostras.

A padronização do  $\mu$ PRN-HRP foi realizada com êxito, com a obtenção de metodologia exequível e adaptada à automação da contagem de PFU de FA pelo software Axiovision.

No entanto, a padronização, com as definições do protocolo de execução e os parâmetros adequados para a contagem de PFU de FA pelo software, teve como grande desafio a utilização de lote do substrato TB com menos de 14 meses de fabricação, apesar do fabricante indicar 30 meses de validade; um complicador para o processo de compra e entrega do reagente, condicionado ao burocrático processo licitatório. Como esse reagente é fundamental na coloração (intensidade de marcação) de PFU, as diluições ideais do anticorpo monoclonal e do vírus, e, conseqüentemente, o sucesso do teste são dependentes do seu funcionamento ótimo.

Assim como observado na metodologia para FA, o grupo colaborativo da GSK comprovou que o TB apresenta bom desempenho (marcação ótima) para o  $\mu$ PRN-HRP de dengue quando utilizado até os primeiros 14 meses de fabricação. Os dados

obtidos promoveram a inclusão dessa informação no certificado de análise do reagente pelo fabricante.

A partir da definição do protocolo de execução foi possível conhecer o desempenho da nova abordagem metodológica proposta nesse estudo por meio dos ensaios de validação e avaliação comparativa com o teste referência.

O planejamento dos ensaios de validação foi, inicialmente, guiado pelas normas estabelecidas pela Resolução vigente da ANVISA<sup>270</sup>. Esta dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos, sendo o documento seguido pelo setor de Bio-Manguinhos responsável pela validação da metodologia utilizada nos ensaios clínicos de avaliação da resposta vacinal (micro PRNT).

Os critérios de análise estabelecidos na Resolução são, em geral, inconsistentes com as características do PRNT e as suas variações metodológicas. Talvez, o distanciamento dessas normas para a avaliação específica dos testes de quantificação de anticorpos neutralizantes possa ser explicado pelas próprias definições empregadas na Resolução. Métodos bioanalíticos são definidos como “métodos analíticos utilizados na determinação quantitativa de analitos em matrizes biológicas”, em que matriz biológica é o “meio de origem biológica no qual os analitos em estudo serão quantificados” e analito seria o “composto químico específico a ser mensurado em uma matriz”<sup>270</sup>.

Além disso, a Resolução exige ensaios de validação em que i) as respostas obtidas não correspondem às obtidas pelos testes de neutralização (como as análises de curva de calibração, efeito residual e efeito matriz), ou ii) as definições do ensaio e seu respectivo critério de análise precisam ser alterados para que as respostas exigidas se aproximem das obtidas por testes de neutralização (como exatidão e seletividade); e ainda quando iii) o critério de análise a ser alcançado não considera a variabilidade intrínseca ao teste.

Finalmente, a própria Resolução dispõe sobre a preferência para a análise das moléculas por métodos cromatográficos<sup>270</sup>, o que pode justificar aqueles ensaios e os critérios de análises exigidos.

Objetivando a realização de uma validação científica e regulatória, o plano de validação proposto nesse estudo foi traçado a partir de adaptações da Resolução vigente, tomando como base trabalhos de outros grupos que também propuseram a padronização, otimização e validação de novas metodologias para a quantificação de anticorpos neutralizantes em ensaios clínicos de avaliação da resposta

vacinal<sup>264,268,293</sup>. A maior parte destes trabalhos foi realizada em consonância com as recomendações da Agência reguladora dos Estados Unidos ("Food and Drug Administration" - FDA) para a validação de métodos bioanalíticos<sup>300</sup>.

Todos os critérios de análise predefinidos para os ensaios de validação foram alcançados pelas metodologias índices avaliadas (micro PRNT e  $\mu$ PRN-HRP), à exceção do CV de até 15% na análise de precisão do micro PRNT. Das 80 determinações obtidas para o teste, somente 3 foram superiores aos 15%, mas não excederam os 20%.

Estes dados exemplificam a questão do critério de análise estabelecido pela Resolução não considerar a variabilidade intrínseca ao teste. CV superior aos 20% são comumente aceitos para ensaios de neutralização<sup>264</sup>.

Um relatório de validação dos dados obtidos nesse estudo para o micro PRNT foi escrito e aprovado pelo setor de validação de Bio-Manguinhos. O mesmo procedimento deverá ser realizado para o  $\mu$ PRN-HRP para o seu uso em estudos de avaliação da imunogenicidade da vacina para FA.

O plano de validação e os dados obtidos nesse estudo podem servir de base para a elaboração de uma RDC apropriada para testes de neutralização.

Uma nova geração de testes mais rápidos e com algum grau de automação estão sendo desenvolvidos para a quantificação de anticorpos neutralizantes para FA e outros *Flavivirus*<sup>234,264,301-306</sup>. Porém, o PRNT permanece como referência, contra o qual esses novos testes deverão ser validados<sup>227</sup>.

A avaliação comparativa entre os diferentes testes de neutralização, tomando o PRNT como referência, evidenciou o impacto das diferenças metodológicas.

O  $\mu$ PRN-HRP apresentou CCI muito baixo quando os títulos foram comparados em recíproca da diluição. No entanto, esta baixa concordância com o teste referência foi superada para uma concordância quase completa quando a comparação foi realizada com os resultados em mUI/mL. A fraca concordância entre essas metodologias pode ser explicada pelo uso da imunomarcagem, mas também a utilização de fatores de diluição diferentes (fator 3 para o  $\mu$ PRN-HRP e fator 2 para o PRNT).

A avaliação comparativa do micro PRNT com o PRNT resultou em correlação satisfatória, mesmo para os títulos em recíproca da diluição, justificada pelas semelhanças metodológicas, como a utilização do mesmo fator de diluição dos soros.

A seleção dos 200 soros para a realização desse trabalho foi realizada de forma cega e aleatória, desconsiderando os títulos de anticorpos para FA determinados na ocasião do estudo de origem dos soros. Apesar do estudo ter alcançado somente uma população já vacinada para FA, esperava-se a obtenção de ampla variação nos níveis de anticorpos neutralizantes para a sub-amostra de soros utilizada no presente trabalho.

Após o processamento dos 200 soros pelos três testes de neutralização, a consulta ao estudo original dos dados gerados pelo micro PRNT (metodologia anterior ao presente estudo, não otimizada) evidenciou o amplo espectro de títulos de anticorpos esperado para a sub-amostra. A mediana obtida foi de 1:195 (ou 2,29  $\text{Log}_{10}$  da recíproca da diluição). Dos 200 soros, 27 (13,5%) resultaram em títulos <1:50; 56 (28%) com títulos entre 1:50 e 1:149; 74 (37%) com títulos entre 1:150 e 1:449; e 43 (21,5%) com títulos entre 1:450 e 1:640.

Esta distribuição percentual dos diferentes níveis de anticorpos neutralizantes, assim como a mediana foram muito semelhantes às observadas na população do estudo original (total de 434 amostras) e nos testes referência (PRNT) e micro PRNT otimizado no presente estudo.

Por outro lado, o  $\mu$ PRN-HRP apresentou títulos de anticorpos em recíproca da diluição consideravelmente mais altos. Mais de 60% dos 200 soros apresentaram títulos >1:450; e a mediana observada foi 3,5 e 6,7 vezes maior que as medianas obtidas para o teste referência e o micro PRNT, respectivamente. Mas a transformação dos títulos em mUI/mL resultou em uma mediana similar às medianas obtidas para as demais metodologias abordadas nesse trabalho, com diferenças menores do que 3 vezes.

Esses dados evidenciaram a importância de se transformar os títulos em recíproca da diluição – considerando o “end-point” determinado para o teste e o fator de diluição empregado para cada metodologia – em unidades internacionais, a partir da calibração do soro padrão interno frente ao soro de referência internacional (NIBSC "YF"). Este, com valor nominal de 143.000 mUI/mL, foi utilizado para os ensaios de calibração dos soros controles internos positivo e negativo (P3 e P1/100, respectivamente), em que se determinou o valor nominal do padrão positivo para cada metodologia.

O processamento de soros sabidamente negativos e com títulos de anticorpos neutralizantes <1:20 (primeira diluição) obtidos por PRNT teria permitido a

determinação dos melhores pontos de corte ("cut-off point") para o micro PRNT e o  $\mu$ PRN-HRP; isto é, aquele que fornece, ao mesmo tempo, a melhor sensibilidade e a melhor especificidade a partir da comparação dos títulos obtidos pelo teste referência e os testes índices.

Portanto, a seleção de uma nova sub-amostra de soros com amplo espectro de resposta imune, incluindo os ausentes de anticorpos para FA, será fundamental para a definição dos pontos de corte e a classificação de "soropositivos" e "soronegativos" a partir dos dados gerados pelas metodologias em placas de 96 poços abordadas nesse trabalho.

Os dados observados nesse estudo sugerem a necessidade de se estabelecer um ponto de corte mais restritivo (diluição/título mais alto correspondente à redução de 50% do vírus) para o  $\mu$ PRN-HRP, cedendo na sensibilidade para alcançar maior especificidade.

Apesar de não haver consenso sobre a melhor porcentagem para a redução de placas de lise entre os laboratórios, o "end-point" de 50% é preferido para a avaliação de soros após a vacinação porque proporciona resultados mais acurados, apresentando sensibilidade e especificidade aceitáveis. Maior redução na contagem de placas de lise ( $\geq 80\%$ ) é útil para estudos epidemiológicos ou com propósito de diagnóstico por evitar ou reduzir a reação cruzada entre *Flavivirus* em áreas endêmicas<sup>227,268</sup>.

As metodologias utilizadas no presente estudo para determinar anticorpos neutralizantes de FA foram estabelecidas com o "end-point" de 50%. O LATEV, como referência para realização de testes de neutralização, colabora em estudos clínicos e pré-clínicos de avaliação da resposta imunológica induzida pelas vacinas 17D e por outras vacinas que estão sendo desenvolvidas na Fiocruz para outros *Flavivirus*. Portanto, a importância de se ter um teste validado e capaz de atender de forma eficiente à demanda de estudos clínicos e pré-clínicos. No entanto, não exclui a utilização destas metodologias no diagnóstico diferencial de infecções por outros *Flavivirus*, considerando que os testes de neutralização são os mais sensíveis e específicos para FA.

A validação e a avaliação comparativa dos testes de neutralização aplicados em placas de 96 poços, propostos neste trabalho, evidenciaram a geração de resultados confiáveis, mostrando-se úteis em estudos clínicos e pré-clínicos de avaliação das vacinas existentes ou em desenvolvimento para FA. O  $\mu$ PRN-HRP

ainda apresenta vantagem em relação ao micro PRNT, e até mesmo ao teste referência, por ser mais rápido, semiautomatizado e com maior capacidade de processamento de amostras.

## 6 CONCLUSÕES

- O micro PRNT foi otimizado com a determinação de critérios de aceitação para o teste: controle viral com faixa aceita de 19-59 PFU/poço; e soros controles padrões com títulos aceitos, em recíproca da diluição, entre 64 e 572 para o P3 e até 7,5 para o P1/100;
- A padronização do  $\mu$ PRN-HRP para a quantificação de anticorpos neutralizantes para FA foi realizada com êxito, com a definição do protocolo de execução, finalizado em 4 dias;
- Os soros padrões foram calibrados frente ao soro de referência internacional e os valores nominais para o padrão positivo P3 foram determinados para cada teste: 10.264 mUI/mL para o micro PRNT, 12.811 mUI/mL para o  $\mu$ PRN-HRP e 18.180 mUI/mL para o PRNT;
- O micro PRNT e o  $\mu$ PRN-HRP foram validados em relação aos ensaios de precisão, exatidão, seletividade e robustez, atendendo aos critérios de análise predefinidos;
- A avaliação comparativa do micro PRNT com o PRNT demonstrou concordância (CCI) satisfatória entre os testes, tanto para os títulos em recíproca da diluição quanto para os títulos em mUI/mL;
- A avaliação comparativa do  $\mu$ PRN-HRP com o PRNT a partir da determinação de CCI evidenciou concordância de fraca a moderada para os títulos em recíproca da diluição, mas concordância de magnitude substancial a quase completa quando os respectivos títulos comparados foram transformados em mUI/mL;
- Os coeficientes de correlação linear obtidos para os testes índices foram muito similares e sugeriram uma correlação moderada com o teste referência para os títulos apresentados em recíproca da diluição e em mUI/mL;

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Monath TP, Vasconcelos PFC. Yellow fever. *J Clin Virol.* 1º de março de 2015;64:160–73.
2. Monath T, Gershman M, Staples J, Barrett A. Yellow Fever Vaccine. In: Plotkin S, Orenstein W, Offit P, organizadores. *Vaccines* [Internet]. 6º ed Philadelphia: Saunders Elsevier; 2013. p. 870–968. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9781455700905>
3. Bauer JH. The Duration of Passive Immunity in Yellow Fever. *Am J Trop Med Hyg.* 1º de novembro de 1931;s1-11(6):451–7.
4. Tigertt W. D., Berge T. O., Gochenour W. S., Gleiser C. A., Eveland W. C., Bruegge C. Vorder, et al. Experimental Yellow Fever. *N Y Acad Sci.* 8 de fevereiro de 1960;22(5 Series II):323–33.
5. Dennis Lewis H., Reisberg Boris E., Crosbie James, Crozier Dan, Conrad Marcel E. The Original Haernorrhagic Fever: Yellow Fever. *Br J Haematol.* novembro de 1969;17(5):455–62.
6. Monath TP, Brinker KR, Chandler FW, Kemp GE, Cropp CB. Pathophysiologic Correlations in a Rhesus Monkey Model of Yellow Fever. *Am J Trop Med Hyg.* 1º de março de 1981;30(2):431–43.
7. Gardner CL, Ryman KD. Yellow fever: a reemerging threat. *Clin Lab Med.* março de 2010;30(1):237–60.
8. Monath TP, Barrett AD. Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever. *Adv Virus Res.* 2003;60:343–95.
9. Staples EJ, Fischer M. 33 - Viral Hemorrhagic Fevers. In: *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease (Ninth Edition)* [Internet]. London: W.B. Saunders; 2013. p. 323–5. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781416043904001922>
10. Rathore MH, Runyon J, Haque T. Emerging Infectious Diseases. *Adv Pediatr.* agosto de 2017;64(1):27–71.
11. ter Meulen J, Sakho M, Koulemou K, Magassouba N, Bah A, Preiser W, et al. Activation of the cytokine network and unfavorable outcome in patients with yellow fever. *J Infect Dis.* 15 de novembro de 2004;190(10):1821–7.
12. Beasley DWC, McAuley AJ, Bente DA. Yellow fever virus: Genetic and phenotypic diversity and implications for detection, prevention and therapy. *Antiviral Res.* 1º de março de 2015;115:48–70.
13. Monath T. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis.* agosto de 2001;1(1):11–20.

14. Manual for the monitoring of yellow fever virus infection [Internet]. [citado 29 de março de 2018]. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68715/WHO\\_IVB\\_04.08.pdf;jsessionid=D3EA5904930CB6C770A281F6AB273F60?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68715/WHO_IVB_04.08.pdf;jsessionid=D3EA5904930CB6C770A281F6AB273F60?sequence=1)
15. Centers for Disease Control and Prevention. Transmission of Yellow Fever Virus [Internet]. Yellow Fever. 2015 [citado 17 de setembro de 2017]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/yellowfever/transmission/index.html>
16. Vasconcelos PF da C. Febre Amarela. *Rev Soc Bras Med Trop.* abril de 2003;36(2):275–93.
17. Monath TP. Yellow Fever Vaccine. In: Plotkin S, Orenstein W, Offit P, organizadores. *Vaccines*. 4<sup>o</sup> ed Philadelphia: WA Saunders Company; 2004. p. 1095–176.
18. Bryant JE, Holmes EC, Barrett ADT. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. *PLoS Pathog.* 18 de maio de 2007;3(5):e75.
19. Moreno ES, Spinola R, Tengan CH, Brasil RA, Siciliano MM, Coimbra TLM, et al. Yellow fever epizootics in non-human primates, São Paulo state, Brazil, 2008-2009. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* fevereiro de 2013;55(1):45–50.
20. Tomori O. Yellow fever: the recurring plague. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2004;41(4):391–427.
21. World Health Organization. Yellow fever [Internet]. Media Centre. 2018 [citado 17 de setembro de 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>
22. Garske T, Van Kerkhove MD, Yactayo S, Ronveaux O, Lewis RF, Staples JE, et al. Yellow Fever in Africa: estimating the burden of disease and impact of mass vaccination from outbreak and serological data. *PLoS Med.* maio de 2014;11(5):e1001638.
23. Robertson SE, Hull BP, Tomori O, Bele O, LeDuc JW, Esteves K. Yellow fever: a decade of reemergence. *JAMA.* 9 de outubro de 1996;276(14):1157–62.
24. World Health Organization. Yellow fever in Africa and the Americas, 2016. *Releve Epidemiol Hebd.* 11 de 2017;92(32):442–52.
25. World Health Organization. Yellow fever [Internet]. Emergencies preparedness, response. [citado 21 de setembro de 2017]. Disponível em: [http://www.who.int/csr/don/archive/disease/yellow\\_fever/en/](http://www.who.int/csr/don/archive/disease/yellow_fever/en/)
26. Tuboi SH, Costa ZGA, da Costa Vasconcelos PF, Hatch D. Clinical and epidemiological characteristics of yellow fever in Brazil: analysis of reported cases 1998-2002. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* fevereiro de 2007;101(2):169–75.

27. Vasconcelos PF da C. Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. *Rev Saude Publica*. dezembro de 2010;44(6):1144–9.
28. Mir D, Delatorre E, Bonaldo M, Lourenço-de-Oliveira R, Vicente AC, Bello G. Phylodynamics of Yellow Fever Virus in the Americas: new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. *Sci Rep*. 7 de agosto de 2017;7(1):7385.
29. Manual de Vigilância Epidemiológica de Febre Amarela [Internet]. [citado 29 de março de 2018]. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_epid\\_febre\\_amarela.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_epid_febre_amarela.pdf)
30. Goenaga S, Fabbri C, Dueñas JCR, Gardenal CN, Rossi GC, Calderon G, et al. Isolation of yellow fever virus from mosquitoes in Misiones province, Argentina. *Vector Borne Zoonotic Dis* Larchmt N. novembro de 2012;12(11):986–93.
31. Monitoramento dos Casos e Óbitos de Febre Amarela no Brasil - INFORME - Nº 43/2017 [Internet]. [citado 29 de março de 2018]. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/02/COES-FEBRE-AMARELA---INFORME-43---Atualiza----o-em-31maio2017.pdf>
32. Costa ZGA, Romano APM, Elkhoury ANM, Flannery B. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. *Rev Pan-Amaz Saúde*. março de 2011;2(1):11–26.
33. Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica / Dados [Internet]. Portal da Saúde – Ministério da Saúde – [www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br). 2017 [citado 17 de setembro de 2017]. Disponível em: <http://u.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-febreamarela>
34. World Health Organization. WHO | Yellow fever – Brazil [Internet]. Emergencies preparedness, response. 2018 [citado 27 de março de 2018]. Disponível em: <http://www.who.int/csr/don/09-march-2018-yellow-fever-brazil/en/>
35. Ministério da Saúde. Febre amarela: Ministério da Saúde atualiza casos no país [Internet]. 2018 [citado 27 de março de 2018]. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42655-febre-amarela-ministerio-da-saude-atualiza-casos-no-pais>
36. World Health Organization. Yellow fever surveillance and outbreak response: revision of case definitions, October 2010. *Releve Epidemiol Hebd*. 19 de novembro de 2010;85(47):465–72.
37. Vasconcelos PF, Costa ZG, Travassos Da Rosa ES, Luna E, Rodrigues SG, Barros VL, et al. Epidemic of jungle yellow fever in Brazil, 2000: implications of climatic alterations in disease spread. *J Med Virol*. novembro de 2001;65(3):598–604.
38. de Souza RP, Foster PG, Sallum MAM, Coimbra TLM, Maeda AY, Silveira VR, et al. Detection of a new yellow fever virus lineage within the South American genotype I in Brazil. *J Med Virol*. janeiro de 2010;82(1):175–85.

39. Cardoso J da C, de Almeida MAB, dos Santos E, da Fonseca DF, Sallum MAM, Noll CA, et al. Yellow fever virus in *Haemagogus leucocelaenus* and *Aedes serratus* mosquitoes, southern Brazil, 2008. *Emerg Infect Dis.* dezembro de 2010;16(12):1918–24.
40. Mutebi JP, Wang H, Li L, Bryant JE, Barrett AD. Phylogenetic and evolutionary relationships among yellow fever virus isolates in Africa. *J Virol.* agosto de 2001;75(15):6999–7008.
41. von Lindern JJ, Aroner S, Barrett ND, Wicker JA, Davis CT, Barrett ADT. Genome analysis and phylogenetic relationships between east, central and west African isolates of Yellow fever virus. *J Gen Virol.* 2006;87(4):895–907.
42. McMullan LK, Frace M, Sammons SA, Shoemaker T, Balinandi S, Wamala JF, et al. Using next generation sequencing to identify yellow fever virus in Uganda. *Virology.* 5 de janeiro de 2012;422(1):1–5.
43. Stock NK, Laraway H, Faye O, Diallo M, Niedrig M, Sall AA. Biological and phylogenetic characteristics of yellow fever virus lineages from West Africa. *J Virol.* março de 2013;87(5):2895–907.
44. Sall AA, Faye O, Diallo M, Firth C, Kitchen A, Holmes EC. Yellow fever virus exhibits slower evolutionary dynamics than dengue virus. *J Virol.* janeiro de 2010;84(2):765–72.
45. Beck A, Guzman H, Li L, Ellis B, Tesh RB, Barrett ADT. Phylogeographic reconstruction of African yellow fever virus isolates indicates recent simultaneous dispersal into east and west Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(3):e1910.
46. World Health Organization. Yellow fever in Africa and South America, 2011–2012. *Releve Epidemiol Hebd.* 12 de julho de 2013;88(28):285–96.
47. Auguste AJ, Lemey P, Pybus OG, Suchard MA, Salas RA, Adesiyun AA, et al. Yellow fever virus maintenance in Trinidad and its dispersal throughout the Americas. *J Virol.* outubro de 2010;84(19):9967–77.
48. Nunes MRT, Palacios G, Cardoso JF, Martins LC, Sousa EC, de Lima CPS, et al. Genomic and phylogenetic characterization of Brazilian yellow fever virus strains. *J Virol.* dezembro de 2012;86(24):13263–71.
49. Bryant JE, Barrett ADT. Comparative phylogenies of yellow fever isolates from Peru and Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 28 de novembro de 2003;39(2):103–18.
50. Vasconcelos PFC, Bryant JE, da Rosa TPA, Tesh RB, Rodrigues SG, Barrett ADT. Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus, Brazil. *Emerg Infect Dis.* setembro de 2004;10(9):1578–84.
51. Bryant J, Wang H, Cabezas C, Ramirez G, Watts D, Russell K, et al. Enzootic transmission of yellow fever virus in Peru. *Emerg Infect Dis.* agosto de 2003;9(8):926–33.

52. Baronti C, Goitia NJV, Cook S, Roca Y, Revollo J, Flores JV, et al. Molecular epidemiology of yellow fever in Bolivia from 1999 to 2008. *Vector Borne Zoonotic Dis* Larchmt N. março de 2011;11(3):277–84.
53. Auguste AJ, Lemey P, Bergren NA, Giambalvo D, Moncada M, Morón D, et al. Enzootic transmission of yellow fever virus, Venezuela. *Emerg Infect Dis*. janeiro de 2015;21(1):99–102.
54. Bonaldo MC, Gómez MM, Dos Santos AA, Abreu FVS de, Ferreira-de-Brito A, Miranda RM de, et al. Genome analysis of yellow fever virus of the ongoing outbreak in Brazil reveals polymorphisms. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. junho de 2017;112(6):447–51.
55. Cavalcante KRLJ, Tauil PL. Epidemiological characteristics of yellow fever in Brazil, 2000-2012. *Epidemiol E Serv Saude Rev Sist Unico Saude Bras*. março de 2016;25(1):11–20.
56. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier; 2011. 1462 p.
57. Liang G, Gao X, Gould EA. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerg Microbes Infect*. março de 2015;4(3):e18.
58. Calisher CH, Beaty BJ, Chandler LJ. Arboviruses. In: Lennette EH, Smith TF, organizadores. *Laboratory diagnosis of viral infections*. Third. New York: Marcel Dekker, Inc; 1999. p. 305–32.
59. Stapleton JT, Fong S, Muerhoff AS, Bukh J, Simmonds P. The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J Gen Virol*. fevereiro de 2011;92(Pt 2):233–46.
60. Shi M, Lin X-D, Vasilakis N, Tian J-H, Li C-X, Chen L-J, et al. Divergent Viruses Discovered in Arthropods and Vertebrates Revise the Evolutionary History of the Flaviviridae and Related Viruses. *J Virol*. 15 de 2016;90(2):659–69.
61. Sampath A, Padmanabhan R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral Res*. janeiro de 2009;81(1):6–15.
62. Findlay GM, Stern RO. The essential neurotropism of the yellow fever virus. *J Pathol Bacteriol*. 1º de novembro de 1935;41(3):431–8.
63. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol*. 1990;44:649–88.
64. Bonaldo MC, Garratt RC, Freire MS, Galler R. Expression of foreign protein epitopes at the surface of recombinant yellow fever 17D viruses based on three-dimensional modeling of its envelope protein. *Cell Biochem Biophys*. 2006;44(3):313–24.
65. Lindenbach BD, Prágai BM, Montserret R, Beran RKF, Pyle AM, Penin F, et al. The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that

- regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *J Virol.* setembro de 2007;81(17):8905–18.
66. Proutski V, Gaunt MW, Gould EA, Holmes EC. Secondary structure of the 3'-untranslated region of yellow fever virus: implications for virulence, attenuation and vaccine development. *J Gen Virol.* julho de 1997;78 ( Pt 7):1543–9.
  67. Proutski V, Gould EA, Holmes EC. Secondary structure of the 3' untranslated region of flaviviruses: similarities and differences. *Nucleic Acids Res.* 15 de março de 1997;25(6):1194–202.
  68. Bredenbeek PJ, Kooi EA, Lindenbach B, Huijckman N, Rice CM, Spaan WJM. A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. *J Gen Virol.* maio de 2003;84(Pt 5):1261–8.
  69. Fernandez-Garcia M-D, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe.* 23 de abril de 2009;5(4):318–28.
  70. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell.* 8 de março de 2002;108(5):717–25.
  71. Zhang Y, Corver J, Chipman PR, Zhang W, Pletnev SV, Sedlak D, et al. Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J.* 2 de junho de 2003;22(11):2604–13.
  72. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol.* janeiro de 2005;3(1):13–22.
  73. Arjona A, Ledizet M, Anthony K, Bonafé N, Modis Y, Town T, et al. West Nile virus envelope protein inhibits dsRNA-induced innate immune responses. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de dezembro de 2007;179(12):8403–9.
  74. Perera R, Khaliq M, Kuhn RJ. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Res.* outubro de 2008;80(1):11–22.
  75. Roehrig JT. Antigenic structure of flavivirus proteins. *Adv Virus Res.* 2003;59:141–75.
  76. Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol.* maio de 1991;65(5):2467–75.
  77. Zhang L, Mohan PM, Padmanabhan R. Processing and localization of Dengue virus type 2 polyprotein precursor NS3-NS4A-NS4B-NS5. *J Virol.* dezembro de 1992;66(12):7549–54.
  78. Arias CF, Preugschat F, Strauss JH. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology.* abril de 1993;193(2):888–99.

79. Li H, Clum S, You S, Ebner KE, Padmanabhan R. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J Virol.* abril de 1999;73(4):3108–16.
80. Benarroch D, Selisko B, Locatelli GA, Maga G, Romette J-L, Canard B. The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus protein NS3 are Mg<sup>2+</sup>-dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. *Virology.* 25 de outubro de 2004;328(2):208–18.
81. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Flaviviridae - Genus: Flavivirus [Internet]. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2018. Disponível em: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus)
82. Egloff M-P, Benarroch D, Selisko B, Romette J-L, Canard B. An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *EMBO J.* 3 de junho de 2002;21(11):2757–68.
83. Ray D, Shi P-Y. Recent advances in flavivirus antiviral drug discovery and vaccine development. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc.* janeiro de 2006;1(1):45–55.
84. Grun JB, Brinton MA. Characterization of West Nile virus RNA-dependent RNA polymerase and cellular terminal adenylyl and uridylyl transferases in cell-free extracts. *J Virol.* dezembro de 1986;60(3):1113–24.
85. Chu PW, Westaway EG. Characterization of Kunjin virus RNA-dependent RNA polymerase: reinitiation of synthesis in vitro. *Virology.* abril de 1987;157(2):330–7.
86. Tan BH, Fu J, Sugrue RJ, Yap EH, Chan YC, Tan YH. Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. *Virology.* 15 de fevereiro de 1996;216(2):317–25.
87. Ackermann M, Padmanabhan R. De novo synthesis of RNA by the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase. *J Biol Chem.* 26 de outubro de 2001;276(43):39926–37.
88. Guyatt KJ, Westaway EG, Khromykh AA. Expression and purification of enzymatically active recombinant RNA-dependent RNA polymerase (NS5) of the flavivirus Kunjin. *J Virol Methods.* março de 2001;92(1):37–44.
89. Westaway EG, Mackenzie JM, Kenney MT, Jones MK, Khromykh AA. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *J Virol.* setembro de 1997;71(9):6650–61.

90. Lindenbach BD, Rice CM. Trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *J Virol.* dezembro de 1997;71(12):9608–17.
91. Avirutnan P, Hauhart RE, Somnuk P, Blom AM, Diamond MS, Atkinson JP. Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1º de julho de 2011;187(1):424–33.
92. Mackenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, Westaway EG. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology.* 5 de junho de 1998;245(2):203–15.
93. Roosendaal J, Westaway EG, Khromykh A, Mackenzie JM. Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein. *J Virol.* maio de 2006;80(9):4623–32.
94. Ambrose RL, Mackenzie JM. A conserved peptide in West Nile virus NS4A protein contributes to proteolytic processing and is essential for replication. *J Virol.* novembro de 2011;85(21):11274–82.
95. Kaufusi PH, Kelley JF, Yanagihara R, Nerurkar VR. Induction of endoplasmic reticulum-derived replication-competent membrane structures by West Nile virus non-structural protein 4B. *PLoS One.* 2014;9(1):e84040.
96. Guo J-T, Hayashi J, Seeger C. West Nile virus inhibits the signal transduction pathway of alpha interferon. *J Virol.* fevereiro de 2005;79(3):1343–50.
97. Muñoz-Jordán JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martínez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, et al. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol.* julho de 2005;79(13):8004–13.
98. Marianneau P, Steffan AM, Royer C, Drouet MT, Jaeck D, Kirn A, et al. Infection of primary cultures of human Kupffer cells by Dengue virus: no viral progeny synthesis, but cytokine production is evident. *J Virol.* junho de 1999;73(6):5201–6.
99. Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumfheller C, Finke J, Sun W, et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med.* 7 de abril de 2003;197(7):823–9.
100. Barba-Spaeth G, Longman RS, Albert ML, Rice CM. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. *J Exp Med.* 7 de novembro de 2005;202(9):1179–84.
101. Lozach P-Y, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier J-L, et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem.* 24 de junho de 2005;280(25):23698–708.

102. Krishnan MN, Sukumaran B, Pal U, Agaisse H, Murray JL, Hodge TW, et al. Rab 5 is required for the cellular entry of dengue and West Nile viruses. *J Virol.* maio de 2007;81(9):4881–5.
103. Ishak R, Tovey DG, Howard CR. Morphogenesis of yellow fever virus 17D in infected cell cultures. *J Gen Virol.* fevereiro de 1988;69 ( Pt 2):325–35.
104. Ng ML, Lau LC. Possible involvement of receptors in the entry of Kunjin virus into Vero cells. *Arch Virol.* 1988;100(3–4):199–211.
105. Gollins SW, Porterfield JS. Flavivirus infection enhancement in macrophages: an electron microscopic study of viral cellular entry. *J Gen Virol.* setembro de 1985;66 ( Pt 9):1969–82.
106. Hase T, Summers PL, Eckels KH. Flavivirus entry into cultured mosquito cells and human peripheral blood monocytes. *Arch Virol.* 1989;104(1–2):129–43.
107. Allison SL, Schlich J, Stiasny K, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J Virol.* fevereiro de 1995;69(2):695–700.
108. Stiasny K, Bressanelli S, Lepault J, Rey FA, Heinz FX. Characterization of a membrane-associated trimeric low-pH-induced Form of the class II viral fusion protein E from tick-borne encephalitis virus and its crystallization. *J Virol.* março de 2004;78(6):3178–83.
109. Stiasny K, Heinz FX. Flavivirus membrane fusion. *J Gen Virol.* outubro de 2006;87(Pt 10):2755–66.
110. Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science.* 23 de agosto de 1985;229(4715):726–33.
111. Brinton MA. The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:371–402.
112. Chu PW, Westaway EG. Molecular and ultrastructural analysis of heavy membrane fractions associated with the replication of Kunjin virus RNA. *Arch Virol.* 1992;125(1–4):177–91.
113. Mackenzie J. Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic Cph Den.* novembro de 2005;6(11):967–77.
114. Uchil PD, Satchidanandam V. Architecture of the flaviviral replication complex. Protease, nuclease, and detergents reveal encasement within double-layered membrane compartments. *J Biol Chem.* 4 de julho de 2003;278(27):24388–98.
115. Khromykh AA, Westaway EG. RNA binding properties of core protein of the flavivirus Kunjin. *Arch Virol.* 1996;141(3–4):685–99.
116. Mackenzie JM, Westaway EG. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J Virol.* novembro de 2001;75(22):10787–99.

117. Smit JM, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I, Wilschut J. Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses*. fevereiro de 2011;3(2):160–71.
118. Li L, Lok S-M, Yu I-M, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, et al. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science*. 28 de março de 2008;319(5871):1830–4.
119. Yu I-M, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, et al. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science*. 28 de março de 2008;319(5871):1834–7.
120. Watson AM, Klimstra WB. T Cell-Mediated Immunity towards Yellow Fever Virus and Useful Animal Models. *Viruses*. 11 de 2017;9(4).
121. Gaucher D, Therrien R, Kettaf N, Angermann BR, Boucher G, Filali-Mouhim A, et al. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med*. 22 de dezembro de 2008;205(13):3119–31.
122. Pulendran B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(10):741–7.
123. Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D, et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol*. janeiro de 2009;10(1):116–25.
124. Reinhardt B, Jaspert R, Niedrig M, Kostner C, L'age-Stehr J. Development of viremia and humoral and cellular parameters of immune activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: a model of human flavivirus infection. *J Med Virol*. outubro de 1998;56(2):159–67.
125. Miller JD, van der Most RG, Akondy RS, Glidewell JT, Albott S, Masopust D, et al. Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity*. maio de 2008;28(5):710–22.
126. Santos AP, Matos DCS, Bertho AL, Mendonça SCF, Marcovistz R. Detection of Th1/Th2 cytokine signatures in yellow fever 17DD first-time vaccinees through ELISpot assay. *Cytokine*. maio de 2008;42(2):152–5.
127. Akondy RS, Johnson PLF, Nakaya HI, Edupuganti S, Mulligan MJ, Lawson B, et al. Initial viral load determines the magnitude of the human CD8 T cell response to yellow fever vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10 de março de 2015;112(10):3050–5.
128. Martins MA, Silva ML, Marciano APV, Peruhype-Magalhães V, Eloi-Santos SM, Ribeiro JGL, et al. Activation/modulation of adaptive immunity emerges simultaneously after 17DD yellow fever first-time vaccination: is this the key to prevent severe adverse reactions following immunization? *Clin Exp Immunol*. abril de 2007;148(1):90–100.
129. Kohler S, Bethke N, Böhle M, Sommerick S, Frentsch M, Romagnani C, et al. The early cellular signatures of protective immunity induced by live viral vaccination. *Eur J Immunol*. setembro de 2012;42(9):2363–73.

130. Akondy RS, Monson ND, Miller JD, Edupuganti S, Teuwen D, Wu H, et al. The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 de dezembro de 2009;183(12):7919–30.
131. Blom K, Braun M, Ivarsson MA, Gonzalez VD, Falconer K, Moll M, et al. Temporal dynamics of the primary human T cell response to yellow fever virus 17D as it matures from an effector- to a memory-type response. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1º de março de 2013;190(5):2150–8.
132. Co MDT, Terajima M, Cruz J, Ennis FA, Rothman AL. Human cytotoxic T lymphocyte responses to live attenuated 17D yellow fever vaccine: identification of HLA-B35-restricted CTL epitopes on nonstructural proteins NS1, NS2b, NS3, and the structural protein E. *Virology*. 1º de fevereiro de 2002;293(1):151–63.
133. Mudd PA, Piaskowski SM, Neves PCC, Rudersdorf R, Kolar HL, Eernisse CM, et al. The live-attenuated yellow fever vaccine 17D induces broad and potent T cell responses against several viral proteins in Indian rhesus macaques--implications for recombinant vaccine design. *Immunogenetics*. setembro de 2010;62(9):593–600.
134. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods*. 1º de outubro de 2003;281(1–2):65–78.
135. DeWitt WS, Emerson RO, Lindau P, Vignali M, Snyder TM, Desmarais C, et al. Dynamics of the cytotoxic T cell response to a model of acute viral infection. *J Virol*. abril de 2015;89(8):4517–26.
136. Fuertes Marraco SA, Soneson C, Cagnon L, Gannon PO, Allard M, Abed Maillard S, et al. Long-lasting stem cell-like memory CD8+ T cells with a naïve-like profile upon yellow fever vaccination. *Sci Transl Med*. 8 de abril de 2015;7(282):282ra48.
137. Wieten RW, Jonker EFF, van Leeuwen EMM, Remmerswaal EBM, Ten Berge IJM, de Visser AW, et al. A Single 17D Yellow Fever Vaccination Provides Lifelong Immunity; Characterization of Yellow-Fever-Specific Neutralizing Antibody and T-Cell Responses after Vaccination. *PloS One*. 2016;11(3):e0149871.
138. Silva ML, Martins MA, Espírito-Santo LR, Campi-Azevedo AC, Silveira-Lemos D, Ribeiro JGL, et al. Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. *Vaccine*. 10 de janeiro de 2011;29(3):583–92.
139. Campi-Azevedo AC, de Araújo-Porto LP, Luiza-Silva M, Batista MA, Martins MA, Sathler-Avelar R, et al. 17DD and 17D-213/77 yellow fever substrains trigger a balanced cytokine profile in primary vaccinated children. *PloS One*. 2012;7(12):e49828.

140. James EA, LaFond RE, Gates TJ, Mai DT, Malhotra U, Kwok WW. Yellow fever vaccination elicits broad functional CD4+ T cell responses that recognize structural and nonstructural proteins. *J Virol.* dezembro de 2013;87(23):12794–804.
141. Liu T, Chambers TJ. Yellow fever virus encephalitis: properties of the brain-associated T-cell response during virus clearance in normal and gamma interferon-deficient mice and requirement for CD4+ lymphocytes. *J Virol.* março de 2001;75(5):2107–18.
142. Watson AM, Lam LKM, Klimstra WB, Ryman KD. The 17D-204 Vaccine Strain-Induced Protection against Virulent Yellow Fever Virus Is Mediated by Humoral Immunity and CD4+ but not CD8+ T Cells. *PLoS Pathog.* julho de 2016;12(7):e1005786.
143. Roehrig JT, Staudinger LA, Hunt AR, Mathews JH, Blair CD. Antibody prophylaxis and therapy for flavivirus encephalitis infections. *Ann N Y Acad Sci.* dezembro de 2001;951:286–97.
144. Pierson TC, Diamond MS. Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection. *Expert Rev Mol Med.* 12 de maio de 2008;10:e12.
145. Pierson TC, Fremont DH, Kuhn RJ, Diamond MS. Structural insights into the mechanisms of antibody-mediated neutralization of flavivirus infection: implications for vaccine development. *Cell Host Microbe.* 11 de setembro de 2008;4(3):229–38.
146. Porterfield JS. The haemagglutination-inhibition test in the diagnosis of yellow fever in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* maio de 1954;48(3):261–6.
147. Theiler M, Casals J. The serological reactions in yellow fever. *Am J Trop Med Hyg.* novembro de 1958;7(6):585–94.
148. Heinz FX. Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Adv Virus Res.* 1986;31:103–68.
149. Bauer JH, Hudson NP. The Duration of Immunity in Human Yellow Fever as shown by the Protective Power of the Serum. *J Prev Med.* 1930;4(3):177–8.
150. Sawyer WA. The Persistence of Yellow Fever Immunity. *J Prev Med.* 1931;5(6):413–28.
151. Pincus S, Mason PW, Konishi E, Fonseca BA, Shope RE, Rice CM, et al. Recombinant vaccinia virus producing the prM and E proteins of yellow fever virus protects mice from lethal yellow fever encephalitis. *Virology.* março de 1992;187(1):290–7.
152. Brandriss MW, Schlesinger JJ, Walsh EE, Briselli M. Lethal 17D yellow fever encephalitis in mice. I. Passive protection by monoclonal antibodies to the envelope proteins of 17D yellow fever and dengue 2 viruses. *J Gen Virol.* fevereiro de 1986;67 ( Pt 2):229–34.

153. Gould EA, Buckley A, Barrett AD, Cammack N. Neutralizing (54K) and non-neutralizing (54K and 48K) monoclonal antibodies against structural and non-structural yellow fever virus proteins confer immunity in mice. *J Gen Virol.* março de 1986;67 ( Pt 3):591–5.
154. Gollins SW, Porterfield JS. A new mechanism for the neutralization of enveloped viruses by antiviral antibody. *Nature.* 15 de maio de 1986;321(6067):244–6.
155. Desprès P, Ruiz-Linarès A, Cahour A, Girard M, Wychowski C, Bouloy M. The 15 amino acid residues preceding the amino terminus of the envelope protein in the yellow fever virus polyprotein precursor act as a signal peptide. *Virus Res.* abril de 1990;16(1):59–75.
156. Ryman KD, Ledger TN, Weir RC, Schlesinger JJ, Barrett AD. Yellow fever virus envelope protein has two discrete type-specific neutralizing epitopes. *J Gen Virol.* junho de 1997;78 ( Pt 6):1353–6.
157. Lobigs M, Dalgarno L, Schlesinger JJ, Weir RC. Location of a neutralization determinant in the E protein of yellow fever virus (17D vaccine strain). *Virology.* dezembro de 1987;161(2):474–8.
158. Daffis S, Kontermann RE, Korimbocus J, Zeller H, Klenk H-D, Ter Meulen J. Antibody responses against wild-type yellow fever virus and the 17D vaccine strain: characterization with human monoclonal antibody fragments and neutralization escape variants. *Virology.* 5 de julho de 2005;337(2):262–72.
159. Klasse PJ, Sattentau QJ. Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses. *J Gen Virol.* setembro de 2002;83(Pt 9):2091–108.
160. Pierson TC, Xu Q, Nelson S, Oliphant T, Nybakken GE, Fremont DH, et al. The Stoichiometry of Antibody-Mediated Neutralization and Enhancement of West Nile Virus Infection. *Cell Host Microbe.* abril de 2007;1(2):135–45.
161. Stiasny K, Kiermayr S, Holzmann H, Heinz FX. Cryptic properties of a cluster of dominant flavivirus cross-reactive antigenic sites. *J Virol.* outubro de 2006;80(19):9557–68.
162. He RT, Innis BL, Nisalak A, Usawattanakul W, Wang S, Kalayanarooj S, et al. Antibodies that block virus attachment to Vero cells are a major component of the human neutralizing antibody response against dengue virus type 2. *J Med Virol.* abril de 1995;45(4):451–61.
163. Chu JJH, Rajamanonmani R, Li J, Bhuvanakantham R, Lescar J, Ng M-L. Inhibition of West Nile virus entry by using a recombinant domain III from the envelope glycoprotein. *J Gen Virol.* fevereiro de 2005;86(Pt 2):405–12.
164. Deng Y-Q, Dai J-X, Ji G-H, Jiang T, Wang H-J, Yang H, et al. A broadly flavivirus cross-neutralizing monoclonal antibody that recognizes a novel epitope within the fusion loop of E protein. *PLoS One.* 11 de janeiro de 2011;6(1):e16059.

165. Kaufmann B, Nybakken GE, Chipman PR, Zhang W, Diamond MS, Fremont DH, et al. West Nile virus in complex with the Fab fragment of a neutralizing monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 de agosto de 2006;103(33):12400–4.
166. Nybakken GE, Nelson CA, Chen BR, Diamond MS, Fremont DH. Crystal structure of the West Nile virus envelope glycoprotein. *J Virol*. dezembro de 2006;80(23):11467–74.
167. Mehlhop E, Whitby K, Oliphant T, Marri A, Engle M, Diamond MS. Complement activation is required for induction of a protective antibody response against West Nile virus infection. *J Virol*. junho de 2005;79(12):7466–77.
168. Mehlhop E, Diamond MS. Protective immune responses against West Nile virus are primed by distinct complement activation pathways. *J Exp Med*. 15 de maio de 2006;203(5):1371–81.
169. Meyer K, Basu A, Przysiecki CT, Lagging LM, Di Bisceglie AM, Conley AJ, et al. Complement-mediated enhancement of antibody function for neutralization of pseudotype virus containing hepatitis C virus E2 chimeric glycoprotein. *J Virol*. março de 2002;76(5):2150–8.
170. Halstead SB. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res*. 2003;60:421–67.
171. Halstead SB, O'Rourke EJ, Allison AC. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. II. Identity of blood and tissue leukocytes supporting in vitro infection. *J Exp Med*. 1º de julho de 1977;146(1):218–29.
172. Cardoso MJ, Porterfield JS, Gordon S. Complement receptor mediates enhanced flavivirus replication in macrophages. *J Exp Med*. 1º de julho de 1983;158(1):258–63.
173. Gollins SW, Porterfield JS. Flavivirus infection enhancement in macrophages: radioactive and biological studies on the effect of antibody on viral fate. *J Gen Virol*. agosto de 1984;65 ( Pt 8):1261–72.
174. Schlesinger JJ, Brandriss MW. Growth of 17D yellow fever virus in a macrophage-like cell line, U937: role of Fc and viral receptors in antibody-mediated infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. agosto de 1981;127(2):659–65.
175. Monath TP, Cropp CB, Muth DJ, Calisher CH. Indirect fluorescent antibody test for the diagnosis of yellow fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1981;75(2):282–6.
176. Ocegüera LF, Patiris PJ, Chiles RE, Busch MP, Tobler LH, Hanson CV. Flavivirus serology by Western blot analysis. *Am J Trop Med Hyg*. julho de 2007;77(1):159–63.
177. Falconar AK, Young PR. Production of dimer-specific and dengue virus group cross-reactive mouse monoclonal antibodies to the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J Gen Virol*. abril de 1991;72 ( Pt 4):961–5.

178. Shi P-Y, Wong SJ. Serologic diagnosis of West Nile virus infection. *Expert Rev Mol Diagn.* novembro de 2003;3(6):733–41.
179. Churdboonchart V, Bhamarapravati N, Peampramprecha S, Sirinavin S. Antibodies against dengue viral proteins in primary and secondary dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* maio de 1991;44(5):481–93.
180. Stokes A, Bauert JH, Hudson NP. Experimental transmission of yellow fever virus to laboratory animals. *Int J Infect Dis.* 1997;1(2):54–9.
181. Stokes A., Bauer J.H., Hudson N. Paul, Mortimer P.P. The transmission of yellow fever to *Macacus rhesus*. *Rev Med Virol.* 21 de maio de 2001;11(3):141–8.
182. Theiler M. Studies on the Action of Yellow Fever Virus in Mice. *Ann Trop Med Parasitol.* 8 de julho de 1930;24(2):249–72.
183. Sellards AW. The Behavior of the Virus of Yellow Fever in Monkeys and Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* junho de 1931;17(6):339–43.
184. Theiler M, Smith HH. THE EFFECT OF PROLONGED CULTIVATION IN VITRO UPON THE PATHOGENICITY OF YELLOW FEVER VIRUS. *J Exp Med.* 31 de maio de 1937;65(6):767–86.
185. Theiler M, Smith HH. THE USE OF YELLOW FEVER VIRUS MODIFIED BY IN VITRO CULTIVATION FOR HUMAN IMMUNIZATION. *J Exp Med.* 31 de maio de 1937;65(6):787–800.
186. Barrett ADT, Teuwen DE. Yellow fever vaccine - how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? *Curr Opin Immunol.* junho de 2009;21(3):308–13.
187. Ferguson M, Shin J, Knezevic I, Minor P, Barrett A. WHO Working Group on Technical Specifications for Manufacture and Evaluation of Yellow Fever Vaccines, Geneva, Switzerland, 13–14 May 2009. *Vaccine.* 6 de dezembro de 2010;28(52):8236–45.
188. Galler R, Post PR, Santos CN, Ferreira II. Genetic variability among yellow fever virus 17D substrains. *Vaccine.* junho de 1998;16(9–10):1024–8.
189. Marchevsky RS, Freire MS, Coutinho ESF, Galler R. Neurovirulence of yellow fever 17DD vaccine virus to rhesus monkeys. *Virology.* 10 de novembro de 2003;316(1):55–63.
190. Schoub B, Blackburn N. Flaviviruses. In: Zuckerman A, Banatvala J, Pattison J, Griffiths P, Schoub B, organizadores. *Principles and practice of clinical virology.* 5º ed John Wiley & Sons Ltd; 2004. p. 531–54.
191. Stock NK, Boschetti N, Herzog C, Appelhans MS, Niedrig M. The phylogeny of yellow fever virus 17D vaccines. *Vaccine.* 1º de fevereiro de 2012;30(6):989–94.

192. Xie H, Cass AR, Barrett AD. Yellow fever 17D vaccine virus isolated from healthy vaccinees accumulates very few mutations. *Virus Res.* maio de 1998;55(1):93–9.
193. Barban V, Girerd Y, Aguirre M, Gulia S, Pétiard F, Riou P, et al. High stability of yellow fever 17D-204 vaccine: a 12-year retrospective analysis of large-scale production. *Vaccine.* 12 de abril de 2007;25(15):2941–50.
194. Barrett ADT, Higgs S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Annu Rev Entomol.* 2007;52:209–29.
195. Paules CI, Fauci AS. Yellow Fever - Once Again on the Radar Screen in the Americas. *N Engl J Med.* 13 de 2017;376(15):1397–9.
196. Shearer FM, Moyes CL, Pigott DM, Brady OJ, Marinho F, Deshpande A, et al. Global yellow fever vaccination coverage from 1970 to 2016: an adjusted retrospective analysis. *Lancet Infect Dis.* novembro de 2017;17(11):1209–17.
197. Monath TP, Woodall JP, Gubler DJ, Yuill TM, Mackenzie JS, Martins RM, et al. Yellow fever vaccine supply: a possible solution. *Lancet Lond Engl.* 16 de abril de 2016;387(10028):1599–600.
198. Fundação Oswaldo Cruz, Valverde R. Febre Amarela: Bio-Manguinhos produz até 9 milhões de doses da vacina por mês [Internet]. Fiocruz. 2017 [citado 17 de janeiro de 2018]. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/febre-amarela-bio-manguinhos-produz-ate-9-milhoes-de-doses-da-vacina-por-mes>
199. World Health Organization. Eliminate Yellow fever Epidemics (EYE): a global strategy, 2017–2026. *Releve Epidemiol Hebd.* 21 de 2017;92(16):193–204.
200. World Health Organization. WHO | Yellow fever global vaccine stockpile in emergencies [Internet]. WHO. 2016 [citado 17 de janeiro de 2018]. Disponível em: <http://www.who.int/features/2016/yellow-fever-vaccine-stockpile/en/>
201. World Health Organization, SAGE Working Group. Background Paper on Yellow Fever Vaccine [Internet]. World Health Organization; 2013. Disponível em: [http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2013/april/1\\_Background\\_Paper\\_Yellow\\_Fever\\_Vaccines.pdf](http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2013/april/1_Background_Paper_Yellow_Fever_Vaccines.pdf)
202. World Health Organization. Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on immunization, April 2013 – conclusions and recommendations. *Releve Epidemiol Hebd.* 17 de maio de 2013;88(20):201–6.
203. World Health Organization. Vaccines and vaccination against yellow fever. WHO position paper -- June 2013. *Releve Epidemiol Hebd.* 5 de julho de 2013;88(27):269–83.
204. Grobusch MP, Goorhuis A, Wieten RW, Verberk JDM, Jonker EFF, van Genderen PJJ, et al. Yellow fever revaccination guidelines change - a decision too feverish? *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* outubro de 2013;19(10):885–6.

205. Gotuzzo E, Yactayo S, Córdova E. Efficacy and Duration of Immunity after Yellow Fever Vaccination: Systematic Review on the Need for a Booster Every 10 Years. *Am J Trop Med Hyg.* 4 de setembro de 2013;89(3):434–44.
206. World Health Organization. World – Yellow fever vaccination booster [Internet]. WHO - International travel and health. 2014. Disponível em: <http://www.who.int/ith/updates/20140605/en/>
207. Collaborative group for studies on yellow fever vaccines. Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults. *Vaccine.* 3 de setembro de 2014;32(39):4977–84.
208. Campi-Azevedo AC, Costa-Pereira C, Antonelli LR, Fonseca CT, Teixeira-Carvalho A, Villela-Rezende G, et al. Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination. *Hum Vaccines Immunother.* 2016;12(2):491–502.
209. Ministério da Saúde, Blog da Saúde. Febre Amarela: doses fracionadas ajudam no combate à doença [Internet]. Blog da Saúde. 2018 [citado 17 de janeiro de 2018]. Disponível em: <http://www.blog.saude.gov.br/w2e4yw>
210. Ministério da Saúde, Blog da Saúde. Mitos e Verdades sobre a Febre Amarela [Internet]. Blog da Saúde. 2018 [citado 26 de março de 2018]. Disponível em: <http://www.blog.saude.gov.br/bx1li2>
211. World Health Organization Department of Immunization, Vaccines and Biologicals. Fractional dose yellow fever vaccine as a dose-sparing option for outbreak response [Internet]. World Health Organization; 2016. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246236/WHO-YF-SAGE-16.1-eng.pdf?sequence=1>
212. Martins RM, Maia M de LS, Farias RHG, Camacho LAB, Freire MS, Galler R, et al. 17DD yellow fever vaccine: a double blind, randomized clinical trial of immunogenicity and safety on a dose-response study. *Hum Vaccines Immunother.* abril de 2013;9(4):879–88.
213. Campi-Azevedo AC, de Almeida Estevam P, Coelho-Dos-Reis JG, Peruhype-Magalhães V, Villela-Rezende G, Quaresma PF, et al. Subdoses of 17DD yellow fever vaccine elicit equivalent virological/immunological kinetics timeline. *BMC Infect Dis.* 15 de julho de 2014;14:391.
214. Ahuka-Mundeke S, Casey RM, Harris JB, Dixon MG, Nsele PM, Kizito GM, et al. Immunogenicity of Fractional-Dose Vaccine during a Yellow Fever Outbreak - Preliminary Report. *N Engl J Med.* 14 de fevereiro de 2018;
215. Camacho LAB, Freire M da S, Leal M da LF, Aguiar SG de, Nascimento JP do, Iguchi T, et al. Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17DD yellow fever vaccines: a randomized trial. *Rev Saude Publica.* outubro de 2004;38(5):671–8.
216. Minor PD. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. *Virology.* maio de 2015;479–480:379–92.

217. Chan RC, Penney DJ, Little D, Carter IW, Roberts JA, Rawlinson WD. Hepatitis and death following vaccination with 17D-204 yellow fever vaccine. *Lancet Lond Engl.* 14 de julho de 2001;358(9276):121–2.
218. Martin M, Tsai TF, Cropp B, Chang GJ, Holmes DA, Tseng J, et al. Fever and multisystem organ failure associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of four cases. *Lancet Lond Engl.* 14 de julho de 2001;358(9276):98–104.
219. Vasconcelos PF, Luna EJ, Galler R, Silva LJ, Coimbra TL, Barros VL, et al. Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases. *Lancet Lond Engl.* 14 de julho de 2001;358(9276):91–7.
220. Khromava AY, Eidex RB, Weld LH, Kohl KS, Bradshaw RD, Chen RT, et al. Yellow fever vaccine: an updated assessment of advanced age as a risk factor for serious adverse events. *Vaccine.* 9 de maio de 2005;23(25):3256–63.
221. Lindsey NP, Schroeder BA, Miller ER, Braun MM, Hinckley AF, Marano N, et al. Adverse event reports following yellow fever vaccination. *Vaccine.* 11 de novembro de 2008;26(48):6077–82.
222. Martins R de M, Maia M de L de S, Santos EM dos, Cruz RL de S, dos Santos PRG, Carvalho SMD, et al. Yellow Fever Vaccine Post-marketing Surveillance in Brazil. *Procedia Vaccinol.* 1º de janeiro de 2010;2(2):178–83.
223. Galler R, Pugachev KV, Santos CL, Ocran SW, Jabor AV, Rodrigues SG, et al. Phenotypic and molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil. *Virology.* 25 de novembro de 2001;290(2):309–19.
224. An J, Kimura-Kuroda J, Hirabayashi Y, Yasui K. Development of a novel mouse model for dengue virus infection. *Virology.* 10 de outubro de 1999;263(1):70–7.
225. Guirakhoo F, Pugachev K, Zhang Z, Myers G, Levenbook I, Draper K, et al. Safety and efficacy of chimeric yellow Fever-dengue virus tetravalent vaccine formulations in nonhuman primates. *J Virol.* maio de 2004;78(9):4761–75.
226. Robert Putnak J, Collier B-A, Voss G, Vaughn DW, Clements D, Peters I, et al. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. *Vaccine.* 15 de agosto de 2005;23(35):4442–52.
227. Roehrig JT, Hombach J, Barrett ADT. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. *Viral Immunol.* junho de 2008;21(2):123–32.
228. Bassi MR, Kongsgaard M, Steffensen MA, Fenger C, Rasmussen M, Skjødt K, et al. CD8+ T cells complement antibodies in protecting against yellow fever virus. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1º de fevereiro de 2015;194(3):1141–53.
229. World Health Organization. Investigation of yellow fever epidemics in Africa - FIELD GUIDE [Internet]. 2008. Disponível em:

[http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69874/WHO\\_HSE\\_EPR\\_2008.5\\_eng.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69874/WHO_HSE_EPR_2008.5_eng.pdf?sequence=1)

230. Vasconcelos PF da C. Febre amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização. *Rev Bras Epidemiol.* dezembro de 2002;5:244–58.
231. Koraka P, Zeller H, Niedrig M, Osterhaus ADME, Groen J. Reactivity of serum samples from patients with a flavivirus infection measured by immunofluorescence assay and ELISA. *Microbes Infect.* outubro de 2002;4(12):1209–15.
232. Filipe AR, Martins CM, Rocha H. Laboratory infection with Zika virus after vaccination against yellow fever. *Arch Gesamte Virusforsch.* 1973;43(4):315–9.
233. Scott RM, McCown JM, Russell PK. Human immunoglobulin specificity after group B arbovirus infections. *Infect Immun.* setembro de 1972;6(3):277–81.
234. Vázquez S, Valdés O, Pupo M, Delgado I, Alvarez M, Pelegrino JL, et al. MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies after yellow fever vaccination. *J Virol Methods.* 30 de junho de 2003;110(2):179–84.
235. Niedrig M, Kürsteiner O, Herzog C, Sonnenberg K. Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against yellow fever virus. *Clin Vaccine Immunol CVI.* fevereiro de 2008;15(2):177–81.
236. Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Comparison of haemagglutination inhibition (HI) and indirect fluorescent antibody (IFA) techniques for the serological diagnosis of certain flavivirus infections. *J Trop Med Hyg.* junho de 1980;83(3):115–7.
237. Maeda A, Maeda J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *Vet J Lond Engl 1997.* janeiro de 2013;195(1):33–40.
238. De Paula SO, Fonseca BAL da. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Braz J Infect Dis.* dezembro de 2004;8(6):390–8.
239. Santos N, Benati F. Diagnóstico laboratorial das viroses. In: Santos N, Romanos M, Wigg M, organizadores. *Introdução à virologia humana.* 2º ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2008. p. 83–116.
240. Deubel V, Mouly V, Salaun JJ, Adam C, Diop MM, Digoutte JP. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with standard tests used to detect yellow fever virus antibodies. *Am J Trop Med Hyg.* maio de 1983;32(3):565–8.
241. Nogueira RM, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Cavalcanti SM, de Carvalho R. Use of MAC-ELISA for evaluation of yellow fever vaccination. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* outubro de 1992;34(5):447–50.
242. Hogrefe WR, Moore R, Lape-Nixon M, Wagner M, Prince HE. Performance of immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme-linked immunosorbent assays using a

- West Nile virus recombinant antigen (preM/E) for detection of West Nile virus and other flavivirus-specific antibodies. *J Clin Microbiol.* outubro de 2004;42(10):4641–8.
243. Houghton-Triviño N, Montaña D, Castellanos J. Dengue-yellow fever sera cross-reactivity; challenges for diagnosis. *Rev Salud Publica Bogota Colomb.* maio de 2008;10(2):299–307.
244. Gibney KB, Edupuganti S, Panella AJ, Kosoy OI, Delorey MJ, Lanciotti RS, et al. Detection of anti-yellow fever virus immunoglobulin M antibodies at 3-4 years following yellow fever vaccination. *Am J Trop Med Hyg.* dezembro de 2012;87(6):1112–5.
245. Ravi V, Desai AS, Shenoy PK, Satishchandra P, Chandramuki A, Gourie-Devi M. Persistence of Japanese encephalitis virus in the human nervous system. *J Med Virol.* agosto de 1993;40(4):326–9.
246. Porterfield JS. A plaque technique for the titration of yellow fever virus and antisera. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* novembro de 1959;53:458–66.
247. De Madrid AT, Porterfield JS. A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bull World Health Organ.* 1969;40(1):113–21.
248. Niedrig M, Lademann M, Emmerich P, Lafrenz M. Assessment of IgG antibodies against yellow fever virus after vaccination with 17D by different assays: neutralization test, haemagglutination inhibition test, immunofluorescence assay and ELISA. *Trop Med Int Health TM IH.* dezembro de 1999;4(12):867–71.
249. Sawyer WA, Lloyd W. The Use Of Mice in Tests of Immunity Against Yellow Fever. *J Exp Med.* 30 de setembro de 1931;54(4):533–55.
250. Whitman L. A Modified Intraperitoneal Protection Test for Yellow Fever Based on the Greater Susceptibility of Immature White Mice to the Extraneural Injection of Yellow Fever Virus1. *Am J Trop Med Hyg.* 1º de janeiro de 1943;s1-23(1):17–36.
251. Spector S, Tauraso NM. Yellow fever virus. I. Development and evaluation of a plaque neutralization test. *Appl Microbiol.* novembro de 1968;16(11):1770–5.
252. Monath T, Cetron M, Teuwen D. Yellow fever vaccine. In: Plotkin S, Orenstein W, Offit P, organizadores. *Vaccines.* 5º ed New York: Elsevier; 2008. p. 959–1055.
253. De Madrid AT, Porterfield JS. The flaviviruses (group B arboviruses): a cross-neutralization study. *J Gen Virol.* abril de 1974;23(1):91–6.
254. Poland JD, Calisher CH, Monath TP, Downs WG, Murphy K. Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bull World Health Organ.* 1981;59(6):895–900.
255. Monath TP, McCarthy K, Bedford P, Johnson CT, Nichols R, Yoksan S, et al. Clinical proof of principle for ChimeriVax: recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections. *Vaccine.* 15 de janeiro de 2002;20(7–8):1004–18.

256. Monath TP, Nichols R, Archambault WT, Moore L, Marchesani R, Tian J, et al. Comparative safety and immunogenicity of two yellow fever 17D vaccines (ARILVAX and YF-VAX) in a phase III multicenter, double-blind clinical trial. *Am J Trop Med Hyg.* maio de 2002;66(5):533–41.
257. Monath TP, Cetron MS, McCarthy K, Nichols R, Archambault WT, Weld L, et al. Yellow fever 17D vaccine safety and immunogenicity in the elderly. *Hum Vaccin.* outubro de 2005;1(5):207–14.
258. Belmusto-Worn VE, Sanchez JL, McCarthy K, Nichols R, Bautista CT, Magill AJ, et al. Randomized, double-blind, phase III, pivotal field trial of the comparative immunogenicity, safety, and tolerability of two yellow fever 17D vaccines (Arilvax and YF-VAX) in healthy infants and children in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* fevereiro de 2005;72(2):189–97.
259. Mason RA, Tauraso NM, Spertzel RO, Ginn RK. Yellow fever vaccine: direct challenge of monkeys given graded doses of 17D vaccine. *Appl Microbiol.* abril de 1973;25(4):539–44.
260. Pereira RC, Silva ANMR, Souza MCO, Silva MV, Neves PPCC, Silva AAMV, et al. An inactivated yellow fever 17DD vaccine cultivated in Vero cell cultures. *Vaccine.* 20 de agosto de 2015;33(35):4261–8.
261. Tottey S, Shoji Y, Jones RM, Chichester JA, Green BJ, Musiychuk K, et al. Plant-Produced Subunit Vaccine Candidates against Yellow Fever Induce Virus Neutralizing Antibodies and Confer Protection against Viral Challenge in Animal Models. *Am J Trop Med Hyg.* fevereiro de 2018;98(2):420–31.
262. Pfister M, Kürsteiner O, Hilfiker H, Favre D, Durrer P, Ennaji A, et al. Immunogenicity and safety of BERNA-YF compared with two other 17D yellow fever vaccines in a phase 3 clinical trial. *Am J Trop Med Hyg.* março de 2005;72(3):339–46.
263. Slifka MK, Leung DYM, Hammarlund E, Raué H-P, Simpson EL, Tofte S, et al. Transcutaneous yellow fever vaccination of subjects with or without atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* fevereiro de 2014;133(2):439–47.
264. Putnak JR, de la Barrera R, Burgess T, Pardo J, Dessy F, Gheysen D, et al. Comparative evaluation of three assays for measurement of dengue virus neutralizing antibodies. *Am J Trop Med Hyg.* julho de 2008;79(1):115–22.
265. Domingo C, Patel P, Yillah J, Weidmann M, Méndez JA, Nakouné ER, et al. Advanced Yellow Fever Virus Genome Detection in Point-of-Care Facilities and Reference Laboratories. *J Clin Microbiol.* dezembro de 2012;50(12):4054–60.
266. Hatanaka V, Benseñor I. Avaliação de testes diagnósticos. In: Benseñor I, Lotufo P, organizadores. *Epidemiologia – Abordagem prática.* 1º ed São Paulo: Sarvier; 2005. p. 221–44.
267. World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixty-third report. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2014;(980):1–489, back cover.

268. Timiryasova TM, Bonaparte MI, Luo P, Zedar R, Hu BT, Hildreth SW. Optimization and validation of a plaque reduction neutralization test for the detection of neutralizing antibodies to four serotypes of dengue virus used in support of dengue vaccine development. *Am J Trop Med Hyg.* maio de 2013;88(5):962–70.
269. Gómez SY, Ocazonez RE. Yellow fever virus 17D neutralising antibodies in vaccinated Colombian people and unvaccinated ones having immunity against dengue. *Rev Salud Publica Bogota Colomb.* dezembro de 2008;10(5):796–807.
270. Ministério da Saúde, ANVISA. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 27, DE 17 DE MAIO DE 2012 [Internet]. 2012. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0027\\_17\\_05\\_2012.pdf/c6edeb56-200d-4482-8a19-99fa11c33fd3](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0027_17_05_2012.pdf/c6edeb56-200d-4482-8a19-99fa11c33fd3)
271. Lopes P. Estatística aplicada à análise de resultados de ensaios de proficiência na avaliação de laboratórios. Instituto Adolfo Lutz; 2003.
272. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet Lond Engl.* 8 de fevereiro de 1986;1(8476):307–10.
273. Kottner J, Audige L, Brorson S, Donner A, Gajewski BJ, Hróbjartsson A, et al. Guidelines for Reporting Reliability and Agreement Studies (GRRAS) were proposed. *Int J Nurs Stud.* junho de 2011;48(6):661–71.
274. Kuo BI. Intraclass correlation coefficient rather than correlation coefficient to examine agreements among different methods measuring valvular area. *Circulation.* abril de 1994;89(4):1910–1.
275. Zaki R, Bulgiba A, Ismail R, Ismail NA. Statistical methods used to test for agreement of medical instruments measuring continuous variables in method comparison studies: a systematic review. *PloS One.* 2012;7(5):e37908.
276. Mcgraw K, Wong SP. Forming Inferences About Some Intraclass Correlation Coefficients. *Psychol Methods.* 1º de março de 1996;1:30–46.
277. Shrout PE, Fleiss JL. Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. *Psychol Bull.* março de 1979;86(2):420–8.
278. Sim J, Wright CC. The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. *Phys Ther.* março de 2005;85(3):257–68.
279. Lee KM, Lee J, Chung CY, Ahn S, Sung KH, Kim TW, et al. Pitfalls and important issues in testing reliability using intraclass correlation coefficients in orthopaedic research. *Clin Orthop Surg.* junho de 2012;4(2):149–55.
280. Miot HA. Análise de concordância em estudos clínicos e experimentais. *J Vasc Bras.* junho de 2016;15(2):89–92.
281. Toledo GL, Ovalle II. Correlação e regressão. In: Toledo GL, Ovalle II, organizadores. *Estatística Básica.* 2º ed Atlas S.A; 1995. p. 412–57.

282. Freire MS, Mann GF, Marchevsky RS, Yamamura AMY, Almeida LFC, Jabor AV, et al. Production of yellow fever 17DD vaccine virus in primary culture of chicken embryo fibroblasts: yields, thermo and genetic stability, attenuation and immunogenicity. *Vaccine*. 31 de março de 2005;23(19):2501–12.
283. Marchevsky RS, da Luz Leal M, Homma A, Coutinho ESF, Camacho LAB, Jabor AV, et al. Molecular and phenotypic analysis of a working seed lot of yellow fever virus 17DD vaccine strain produced from the secondary seed lot 102/84 with an additional passage in chicken embryos. *Biologicals*. 1º de setembro de 2006;34(3):191–7.
284. Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine. Randomized, double-blind, multicenter study of the immunogenicity and reactogenicity of 17DD and WHO 17D-213/77 yellow fever vaccines in children: implications for the Brazilian National Immunization Program. *Vaccine*. 20 de abril de 2007;25(16):3118–23.
285. Nascimento Silva JR, Camacho LAB, Siqueira MM, Freire M de S, Castro YP, Maia M de LS, et al. Mutual interference on the immune response to yellow fever vaccine and a combined vaccine against measles, mumps and rubella. *Vaccine*. 26 de agosto de 2011;29(37):6327–34.
286. Simões M, Antonio B Camacho L, Yamamura A, Hime Miranda E, Cajaraville AC, Freire M. Evaluation of accuracy and reliability of the plaque reduction neutralization test (micro-PRNT) in detection of yellow fever virus antibodies. *Biol J Int Assoc Biol Stand*. 30 de setembro de 2012;40.
287. Johnson BW, Kosoy O, Hunsperger E, Beltran M, Delorey M, Guirakhoo F, et al. Evaluation of chimeric Japanese encephalitis and dengue viruses for use in diagnostic plaque reduction neutralization tests. *Clin Vaccine Immunol CVI*. julho de 2009;16(7):1052–9.
288. Choi K-S, Ko Y-J, Nah J-J, Kim Y-J, Kang S-Y, Yoon K-J, et al. Monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detecting and quantifying West Nile virus-neutralizing antibodies in horse sera. *Clin Vaccine Immunol CVI*. fevereiro de 2007;14(2):134–8.
289. Krag P, Macnamara FN, Lyng J, Bentzon MW, Larsen SO. International collaborative assay of the international reference preparation of anti-yellow-fever serum. *Bull World Health Organ*. 1965;33(2):243–55.
290. Abramson JH. WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists. *Epidemiol Perspect Innov*. 17 de dezembro de 2004;1:6.
291. Fernandes-Monteiro AG, Trindade GF, Yamamura AMY, Moreira OC, de Paula VS, Duarte ACM, et al. New approaches for the standardization and validation of a real-time qPCR assay using TaqMan probes for quantification of yellow fever virus on clinical samples with high quality parameters. *Hum Vaccines Immunother*. 2015;11(7):1865–71.
292. Simões M. Avaliação da Acurácia e Confiabilidade do Teste Sorológico de Neutralização por Redução de Placas de Lise (Micro Prnt) na Detecção de

- Anticorpos para o Vírus da Febre Amarela [Mestrado]. [Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos]: Instituto Oswaldo Cruz; 2011.
293. Sarzotti-Kelsoe M, Daniell X, Todd CA, Bilska M, Martelli A, LaBranche C, et al. Optimization and validation of a neutralizing antibody assay for HIV-1 in A3R5 cells. *J Immunol Methods*. julho de 2014;409:147–60.
  294. Wieten RW, Goorhuis A, Jonker EFF, de Bree GJ, de Visser AW, van Genderen PJJ, et al. 17D yellow fever vaccine elicits comparable long-term immune responses in healthy individuals and immune-compromised patients. *J Infect*. junho de 2016;72(6):713–22.
  295. Veit O, Domingo C, Niedrig M, Staehelin C, Sonderegger B, Héquet D, et al. Long-term Immune Response to Yellow Fever Vaccination in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected Individuals Depends on HIV RNA Suppression Status: Implications for Vaccination Schedule. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 19 de março de 2018;66(7):1099–108.
  296. Rang A, Heider H, Ulrich R, Krüger DH. A novel method for cloning of non-cytolytic viruses. *J Virol Methods*. julho de 2006;135(1):26–31.
  297. Handke W, Krüger DH, Rang A. Defective particles can lead to underestimated antibody titers in virus neutralization tests. *Intervirology*. 2009;52(6):335–9.
  298. Bangham CR, Kirkwood TB. Defective interfering particles and virus evolution. *Trends Microbiol*. outubro de 1993;1(7):260–4.
  299. Kirkwood TB, Bangham CR. Cycles, chaos, and evolution in virus cultures: a model of defective interfering particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30 de agosto de 1994;91(18):8685–9.
  300. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation [Internet]. 2001. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf>
  301. Vorndam V, Beltran M. Enzyme-linked immunosorbent assay-format microneutralization test for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg*. fevereiro de 2002;66(2):208–12.
  302. Martin NC, Pardo J, Simmons M, Tjaden JA, Widjaja S, Marovich MA, et al. An immunocytometric assay based on dengue infection via DC-SIGN permits rapid measurement of anti-dengue neutralizing antibodies. *J Virol Methods*. junho de 2006;134(1–2):74–85.
  303. Pierson TC, Sánchez MD, Puffer BA, Ahmed AA, Geiss BJ, Valentine LE, et al. A rapid and quantitative assay for measuring antibody-mediated neutralization of West Nile virus infection. *Virology*. 1º de março de 2006;346(1):53–65.
  304. Kraus AA, Messer W, Haymore LB, de Silva AM. Comparison of plaque- and flow cytometry-based methods for measuring dengue virus neutralization. *J Clin Microbiol*. novembro de 2007;45(11):3777–80.

305. Shanaka WW, Rodrigo I, Alcena DC, Rose RC, Jin X, Schlesinger JJ. An Automated Dengue Virus Microneutralization Plaque Assay Performed in Human Fcy Receptor-expressing CV-1 Cells. *Am J Trop Med Hyg.* 1º de janeiro de 2009;80(1):61–5.
306. Mercier-Delarue S, Durier C, Colin de Verdière N, Poveda J-D, Meiffredy V, Fernandez Garcia MD, et al. Screening test for neutralizing antibodies against yellow fever virus, based on a flavivirus pseudotype. *PloS One.* 2017;12(5):e0177882.

## 8 ANEXO

INSTITUTO NACIONAL DE  
INFECTOLOGIA EVANDRO  
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Padronização, Qualificação e Avaliação Comparativa do Desempenho de Duas Novas Abordagens Metodológicas para a Quantificação dos Anticorpos Neutralizantes para Febre Amarela.

**Pesquisador:** Marisol Simões

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 52793216.4.0000.5262

**Instituição Proponente:** FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.423.860

#### Apresentação do Projeto:

A febre amarela é uma doença infecciosa aguda, febril, causada pelo vírus protótipo do gênero *Flavivirus*. Esta doença permanece como um grande problema de saúde pública, principalmente em regiões endêmicas da África e da América do Sul. A vacinação é a maneira mais eficaz de prevenção e controle da febre amarela, sendo fundamental para impedir uma epidemia. As vacinas disponíveis produzidas com as subcepas 17D-204 e 17DD são seguras e imunogênicas, induzindo a formação de anticorpos neutralizantes, os quais representam o melhor correlato de proteção. Apesar de ser considerado o teste sorológico de referência para a análise da resposta imune protetora após a vacinação, o Teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise (PRNT, do inglês "Plaque Reduction Neutralization Test") é um teste trabalhoso, de difícil execução, requer equipamentos e insumos específicos, além de um tempo longo para a sua finalização, mesmo na versão micro PRNT (em placas de 96 poços). Esta adaptação do método é mais operacional do que o PRNT (em placas de 8 poços), mas apresenta limitações, principalmente de reprodutibilidade. A

busca por um teste eficiente, mais rápido e com um bom desempenho para a quantificação de anticorpos neutralizantes para febre amarela vem ao encontro das necessidades de aumento da capacidade e melhoria de análises das amostras de estudos clínicos e pré-clínicos de avaliação da resposta imune vacinal. Portanto, este estudo objetiva desenvolver (padronizar) duas novas

**Endereço:** Avenida Brasil 4365

**Bairro:** Manguinhos

**CEP:** 21.040-360

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3865-9585

**E-mail:** cep@ini.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.423.860

metodologias mais rápidas e semiautomatizadas para a quantificação de anticorpos neutralizantes para a febre amarela, denominadas  $\mu$ PRN-HRP (do inglês "micro Plaque Reduction Neutralization -Horseradish Peroxidase") e RRNT (do inglês "Replication Reduction Neutralization Test"), além de qualificar (validar) os quatro testes de neutralização ( $\mu$ PRN-HRP, RRNT, micro PRNT e PRNT) e avaliar comparativamente o desempenho dos dois novos testes e do micro PRNT clássico (já estabelecido no Laboratório de Tecnologia Viroológica) com o PRNT, considerado o teste referência. O processo de padronização das duas novas metodologias está avançando conforme esperado, com a determinação das variáveis nas diferentes etapas de cada teste. Finda a padronização, iniciam-se os processos de qualificação e avaliação comparativa do desempenho dos testes de neutralização.

#### Objetivo da Pesquisa:

##### Objetivo Primário:

O presente estudo visa padronizar, qualificar e avaliar o desempenho de duas novas abordagens mais rápidas e semiautomatizadas para a quantificação de anticorpos neutralizantes para o vírus da FA, objetivando a obtenção de um teste com desempenho tão bom quanto ou superior ao teste referência.

##### Objetivo Secundário:

- Padronizar uma nova metodologia de quantificação de anticorpos neutralizantes para FA em que os vírus não neutralizados são marcados com um anticorpo conjugado à peroxidase, permitindo a sua visualização e contagem –  $\mu$ PRN-HRP;
- Padronizar uma nova metodologia para determinação de anticorpos neutralizantes para FA baseada na quantificação de RNA viral dos vírus não neutralizados pela técnica quantitativa de PCR em tempo real – RRNT;
- Qualificar os quatro testes de neutralização – os clássicos PRNT e micro PRNT, além dos padronizados neste estudo:  $\mu$ PRN-HRP e RRNT;
- Avaliar o desempenho dos três testes índices (micro PRNT,  $\mu$ PRN-HRP e RRNT) comparados ao teste referência (PRNT);
- Determinar o melhor ponto de corte para os três testes índices.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

**Riscos:** Não se aplica. Não haverá intervenção direta, apenas utilização de amostras biológicas já coletadas oriundas de outros projetos de pesquisa.

**Benefícios:** Obtenção com um teste de neutralização com melhor desempenho que os atuais para rotina de avaliação resposta imunológica vacinal.

**Endereço:** Avenida Brasil 4365

**Bairro:** Manguinhos

**CEP:** 21.040-360

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3865-9585

**E-mail:** cep@ini.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.423.860

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de soros de doadores do "Protocolo para Obtenção e Produção de Soros in house para Testes de Neutralização por Redução de Placas de Lise (PRNT)" (submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas–IPEC/Fiocruz. Protocolo CAAE 15120813.4.0000.5262) e do "Estudo Duração da Imunidade Após Duas ou Mais Doses de Vacina Contra Febre Amarela em Adultos" (submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca – Ensp/Fiocruz. Protocolo CAAE 15752013.1.0000.5240) serão selecionados para os ensaios de qualificação e análise comparativa do desempenho dos testes de neutralização, respectivamente.

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

Adequados.

**Recomendações:**

Não há.

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

Não há pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_654654.pdf	25/01/2016 14:09:38		Aceito
Outros	COMPROMISSO_RESPONSABILIDAD E_PESQUISADOR.pdf	25/01/2016 14:09:08	Marisol Simões	Aceito
Outros	DISPENSA_TCLE.pdf	25/01/2016 14:08:35	Marisol Simões	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_MARISOL_SIMOES_Versao _1.pdf	25/01/2016 14:08:08	Marisol Simões	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	25/01/2016 14:07:54	Marisol Simões	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Avenida Brasil 4365

**Bairro:** Manguinhos

**CEP:** 21.040-360

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3865-9585

**E-mail:** cep@ini.fiocruz.br

RIO DE JANEIRO, 25 de Fevereiro de 2018

---

**Assinado por:**  
**Léa Ferreira Camillo-Coura**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Avenida Brasil 4365  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3865-9585 **E-mail:** cep@ini.fiocruz.br