

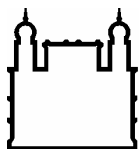
**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**  
**Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

**DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)  
PARA A DETECÇÃO DO ANTÍGENO DO VÍRUS DA FEBRE  
AMARELA (17DD) INATIVADO**

**MAURO FRANÇA DA SILVA**

**RIO DE JANEIRO**

**2007**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**  
**Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

**MAURO FRANÇA DA SILVA**

Desenvolvimento de um Teste Imunoenzimático (ELISA) para a Detecção do  
Antígeno do Vírus da Febre Amarela (17DD) Inativado

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz da  
Fundação Oswaldo Cruz como parte dos requisitos  
necessários para obtenção do título de Mestre em  
Tecnologia de Imunobiológicos.

RIO DE JANEIRO

2007

S586 Silva, Mauro França da

Desenvolvimento de um Teste Imunoenzimático (ELISA) para a Detecção do Antígeno do Vírus da Febre Amarela (17DD) Inativado / Mauro França da Silva.

– Rio de Janeiro, 2007.

xv, 65 f.: il.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Tecnologia de Imunobiológicos, 2007.

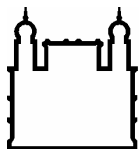
Bibliografia: f. 57-67.

1. Febre amarela. 2. ELISA. 3. Vírus da febre amarela. 4. Vacina de vírus Inativado.

I. Título.

CDD: 616.91854

Trabalho realizado sob a orientação da Profa. Dra. Luciane Pinto Gaspar no Laboratório de Tecnologia Viroológica com a colaboração dos Laboratórios de Tecnologia Bacteriana, de Tecnologia de DNA Recombinante / Biofármacos, da Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos; também os Laboratórios de Desenvolvimento Tecnológico do Instituto Oswaldo Cruz e de Termodinâmica de Proteínas e Estruturas Virais Gregório Weber do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**  
**Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

**Mauro França da Silva**

**DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA A  
DETECÇÃO DO ANTÍGENO DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA (17DD)  
INATIVADO**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Luciane Pinto Gaspar**

**Aprovada em: 31 / 07 / 2007**

**EXAMINADORES:**

**Profa. Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar - Presidente**

**Profa. Dra. Andréa Cheble de Oliveira**

**Prof. Dr. Ricardo Galler**

Rio de Janeiro, 31 de Julho 2007.

Ao meus pais,  
pelo carinho, dedicação, incentivo e lição de vida.

A minha querida esposa Roseana,  
pelo incentivo e apoio em todas as horas.

## AGRADECIMENTOS

À direção de Bio-Manguinhos, pelas condições propiciadas à realização desta tese e pela excelente política de desenvolvimento institucional e do crescimento profissional.

A Profa. Dra. Luciane Pinto Gaspar, responsável direta pela orientação, estruturação e enriquecimento, deste trabalho, pela revisão, paciência, tolerância e incansável estímulo científico.

Ao Dr. Marcos da Silva Freire, chefe do LATEV, pelo incentivo e participação na elaboração do projeto.

Ao colega Ricardo de Carvalho pelo incentivo, apoio e indicação do meu nome para concorrer a uma vaga no MPTI.

À coordenação do MPTI, com agradecimento à coordenadora Profa. Dra. Sheila Farage, pela determinação e mão forte para manter o bom nível do curso.

A excelente secretária do MPTI e amiga Zaira Antunes, pela dedicação, competência e carinho.

À Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar pelo valioso apoio na relatoria deste trabalho.

Ao Dr. Ricardo Galler pela participação na banca de acompanhamento, na análise deste trabalho, pela proposta de aprimorar o trabalho com o estudo de dose resposta, e apoio neste trabalho.

Aos amigos Renato S. Marchevsky e José Mariano, pelo apoio e incentivo na minha vida profissional e pessoal, pela sua competência, por sua lealdade, e pelo ótimo convívio.

Ao chefe do LAFAM, João de Souza pelo incentivo e apoio na concretização deste trabalho. A chefe e amiga Jacqueline das Graças, pelo total apoio, e na realização deste trabalho, pela sua competência lealdade e estimulante cordialidade.

A colegas e amigos do LAFAM, Cláudio, Marcos, Marcelo, Isaias, Ivone, Glória, Regina, Waldemar, Hugo, Rodrigo, Carlos, Levi, Michel e a todos que me incentivaram, e por manterem o bom nível profissional do LAFAM.

Aos grandes amigos do LATEV, Anna Yamamura pelo carinho, atenção e incentivo, Maria Beatriz, Elena Caride, Márcia Archer, Aymara e Alfredo Jabor, pelo companheirismo, ao Luiz Fernando, pela cooperação e apoio na execução das técnicas, Edney, Ivaldo, Gerson, Max, Emanuelle, Adriana e Marlon pelas importantes contribuições.

Aos colegas do LATER/Biofármaco, Ana Carolina, Carlos Otávio, Sérgio Mouta, Eneida e em especial à amiga Márcia Terezinha Baroni que me abriu as portas do laboratório com o apoio do material necessário para execução deste projeto, e contínuo incentivo.

Aos colegas do MPTI, obrigado pelo ótimo convívio, e novos laços de amizade que surgiram: Isabella Maluf (companheira de mesa e amiga para todas as horas), Elaine Maria (amiga

generosa com sua criatividade e inteligência), Mariza Cristina (amiga sempre presente), Luiz Cunha, Denise Aparecida, Cátia, Maria Célia, Fernanda Rimolli, Carlos Renato, Carlos, Wildeberg, Danilo, Rafael, Raouf, Cristine, Luciana, Claudia Molinaro, Pedrinho e Henrriana.

Ao colega Edmilson Baptista do DERED, pelos valiosos papos sobre ELISA, com sua experiência.

Ao colega do SEVCI, Jorge Batista de Almeida, pela valiosa contribuição no suporte das soluções do ELISA, e ao chefe do laboratório Ronaldo Ferreira Dias.

Aos amigos Gerson Silva de Lima, Claudia Molinaro e Maria Amélia, pelo incentivo e ajuda em conseguir insumos para realização deste trabalho.

Aos colegas do LAEAN, Joel Majerowicz (ex-chefe), Fernanda Rimolli, Viviane, Gabriele, Edmilson, Pablo e Rodrigo nas técnicas experimentais realizadas com os animais.

Ao Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico do IOC, chefiado pelo Dro. Marcelo Alves Pinto, pela cooperação na produção do conjugado, e pela colaboração na análise estatística.

Aos colegas do LATEB, Dra. Hellen Jessuron chefe do Laboratório, pela autorização do uso das ultracentrífugas, e pelo grande e cordial apoio de sua competente equipe, Denise Aparecida, Ivna, Denisinha, Maria de Lourdes, Ana Paula, Renata, Solange, William.

Aos colegas Ygara Mendes, Ivanildo Pedro e Natália Alves, do Laboratório de Termodinâmica de Proteínas e Estrutura Virais Gregório Weber do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ, sempre cordiais e presentes.

Ao amigo Carlos Humberto Marques pelo incentivo durante este trabalho.

Ao amigo Dr. José Paulo Gagliardi Leite, pelo apoio e incentivo na minha carreira profissional.

*In memoriam* a Profa. Dra. Jussara Pereira do Nascimento, pelos ensinamentos imprescindíveis na execução deste trabalho.

A todos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram na realização deste projeto.



De tudo ficam três coisas:  
A certeza de que estamos sempre começando,  
A certeza de que é preciso continuar,  
E a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar.  
Fazer da interrupção um caminho novo.  
Da queda um passo de dança.  
Do medo uma escada.  
Do sonho uma ponte.  
Da procura um encontro.

Fernando Pessoa

## ÍNDICE

---

Lista de Abreviaturas e Siglas.....	X-XI
Lista de Quadros.....	XII
Lista de Tabelas.....	XII
Lista de Figuras.....	XIII
Resumo.....	XIV
Abstract.....	XV
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. A origem da Febre Amarela.....	2
1.2. A febre amarela no Brasil e nas Américas.....	4
1.3. Características gerais do vírus da febre amarela.....	7
1.4. A vacina contra a febre amarela.....	11
1.4.1. A vacina no Brasil.....	11
1.4.2. Eventos adversos associados à vacina contra febre amarela.....	15
1.5. Desenvolvimento de vacinas virais com ênfase em vacinas inativadas.....	18
1.6. Metodologias para identificação do vírus da febre amarela.....	19
1.7. Testes Imunológicos.....	19
1.8. Quantificação de vírus presentes em vacinas inativadas .....	20
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
2.1. Objetivo Geral.....	23
2.2. Objetivos Específicos.....	23
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
3.1. Cultivo e manutenção de células.....	24
3.2. Vírus 17DD e produção de estoques virais.....	24
3.3. Vírus 17D, Vírus Dengue 2 e Vírus da Hepatite C.....	25
3.4. Purificação do vírus 17DD.....	25
3.5. Titulação viral.....	26
3.6. Dosagem de proteína pelo método de Bradford .....	26
3.7. Inativação viral .....	27
3.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	27
3.9. Obtenção dos controles (positivo e negativo).....	27
3.10. Obtenção e produção do fluído ascítico – anticorpo monoclonal.....	28
3.11. Purificação dos anticorpos 2D12 e M7.....	28
3.12. Conjugação do anticorpo 2D12 com a peroxidase.....	29

3. 13. Teste imunoenzimático para detecção do antígeno da febre amarela.....	30
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
4.1. Obtenção do antígeno purificado (vírus da febre amarela subcepa 17DD).....	31
4.2. Purificação do anticorpo 2D12.....	32
4.3. Purificação do anticorpo M7.....	33
4.4. Comparação de diferentes anticorpos utilizados como captura na fase sólida visando ao estabelecimento inicial de um teste de ELISA para detecção do vírus 17DD.....	34
4.5. Seleção dos anticorpos de captura para o desenvolvimento de um ELISA para detecção do antígeno 17DD.....	37
4.6. Estabelecimento dos controles positivo e negativo.....	39
4.7. Otimização das condições pré-estabelecidas: estabelecimento do uso do conjugado na diluição 1:2000.....	40
4.8. Análise da especificidade do teste de ELISA para o vírus 17DD atenuado.....	41
4.9. Aplicação do teste de ELISA para detecção do vírus 17DD inativado por formaldeído.....	44
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
5.1. Aspectos gerais necessários ao desenvolvimento de um teste de ELISA.....	46
5.2. Padronização de um teste de ELISA para detecção do vírus da febre amarela: obtenção do vírus 17DD.....	47
5.3. Aspectos gerais relacionados ao desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos ..	48
5.4 Padronização de um teste de ELISA para detecção do vírus da febre amarela: purificação dos anticorpos.....	49
5.5. Produção dos controles positivo e negativo.....	50
5.6. Parâmetros necessários para validação da metodologia desenvolvida.....	51
5.7. Características gerais de partículas virais inativadas.....	52
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>53</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>54</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>55</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

	Assessoria de Segurança do Trabalho e Meio Ambiente
ALV	Termo em inglês “ <i>Avian Leukosis Virus</i> ” – vírus da leucose aviária
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	Termo em inglês “ <i>American Type Culture Collection</i> ” – Coleção Americana de Cultura de Células
°C	Grau Celsius ou centígrados (medida de temperatura)
CMC	Carboxil-metil-celulose
CPE	Termo em inglês “ <i>Cytopathic effect</i> ” – efeito citopático
DEGAQ	Departamento de Garantia da Qualidade
DEPRO	Departamento de Produção
DEQUA	Departamento de Controle de Qualidade
DEVIR	Departamento de Vacinas Virais
DIAPV	Divisão de Apoio de Virais
DIGAC	Divisão de Garantia da Qualidade
DO	Densidade ótica
EP	Termo em inglês “ <i>Egg Passage</i> ” – passagem em ovo
FAC	Fluído Ascítico de Camundongo
FDA	Termo em inglês “ <i>Food Drug Administration</i> ” – Administração de Alimentos e Drogas
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
JEV	Vírus da encefalite Japonesa
Kb	Quilo-bases (1000 bases ou pares de bases)
LACOM	Laboratório de Controle Microbiológico
LAEAN	Laboratório de Experimentação Animal
LAFAM	Laboratório de Produção da Vacina Contra Febre Amarela
LAFIQ	Laboratório de Controle Físico-Químico
LALIO	Laboratório de Liofilização
LAMEV	Laboratório de Metrologia e Validação
LATEV	Laboratório de Tecnologia Viroológica
LCNs	Laboratórios de Controle Nacional

Log /log <sub>10</sub>	Logaritmo na base 10
MPTI	Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos
MS	Ministério da Saúde
ORF	Termo em inglês “ <i>Open Reading Frame</i> ” – faixa de leitura aberta
PAHO	Termo em inglês “ <i>Panamerican Health Organization</i> ”/Organização Pan-Americana de Saúde
PBS	Termo em inglês “ <i>Phosphate Buffer Saline</i> ” – tampão salina fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
PFU	Termo em inglês “ <i>Plaque Forming Units</i> ” – unidades formadoras de placas de lise
POP	Procedimento Operacional Padrão
PM	Peso molecular, ou massa molar
PNI	Programa Nacional de Imunizações
RE	Retículo endoplasmático
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
SPF	Termo em inglês “ <i>Specific Pathogen Free</i> ” – livres de patógenos específicos
TBEV	Termo em inglês “ <i>Tick Borne Encephalitis Vírus</i> ” – vírus da encefalite transmitida por carrapatos
TMB	Tetra-metil-benzidina
VDTEC	Vice Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico
Vero	Linhagem de células de macaco verde africano
WHO	Termo em inglês “ <i>World Health Organization</i> ”/Organização Mundial da Saúde

## LISTA DE QUADROS

---

<b>Quadro 1.1:</b> Produtores mundiais da vacina contra febre amarela.....	13
--	----

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 4.1:</b> Titulação cruzada para determinação da diluição ideal do anticorpo de captura 2D12 não purificado frente ao conjugado (2D12/peroxidase).....	35
<b>Tabela 4.2:</b> Titulação cruzada para determinação da diluição ideal do anticorpo de captura 2D12 não purificado obtido do LATAM frente ao conjugado (2D12/peroxidase).....	36
<b>Tabela 4.3:</b> Titulação cruzada para determinação da diluição ideal do anticorpo de captura 2D12 purificado frente ao conjugado (2D12/peroxidase).....	36
<b>Tabela 4.4:</b> Titulação cruzada para determinação da diluição ideal do anticorpo de captura M7 purificado frente ao conjugado (2D12/peroxidase).....	37
<b>Tabela 4.5:</b> Determinação da titulação cruzada dos anticorpos 2D12 e M7 frente ao conjugado.....	38
<b>Tabela 4.6:</b> Determinação da diluição ideal de uso para os controles positivo e negativo.....	39
<b>Tabela 4.7:</b> Comparação de dois testes diferentes utilizando conjugado na diluição 1:2000 (A) e 1:3000 (B).....	40

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.1:</b> Distribuição geográfica do <i>Aedes aegypti</i> nas Américas.....	5
<b>Figura 1.2:</b> Distribuição global da febre amarela.....	5
<b>Figura 1.3:</b> Regiões onde a febre amarela é endêmica no Brasil.....	6
<b>Figura 1.4:</b> Organização genômica dos flavivírus.....	8
<b>Figura 1.5:</b> Esquema da organização estrutural dos flavivírus.....	9
<b>Figura 1.6:</b> Ciclo infeccioso dos flavivírus.....	10
<b>Figura 1.7:</b> História das passagens do lote semente YF 17DD usada na produção da vacina no Brasil.....	15
<b>Figura 4.1:</b> Purificação do vírus da febre amarela.....	32
<b>Figura 4.2:</b> Purificação do anticorpo 2D12 – anti – febre amarela.....	33
<b>Figura 4.3:</b> Purificação do anticorpo policlonal M7.....	34
<b>Figura 4.4:</b> Comparação entre o anticorpo monoclonal 2D12 e o anticorpo policlonal M7 quando foram utilizados como captura.....	38
<b>Figura 4.5:</b> Análise da detecção do vírus 17DD (atenuado/clarificado) pelo teste de ELISA.....	41
<b>Figura 4.6:</b> Visualização do teste para detecção do vírus 17 DD (atenuado/clarificado) pelo ELISA.....	42
<b>Figura 4.7:</b> Análise da especificidade do ELISA utilizando os vírus da dengue 2 e da hepatite C.....	42
<b>Figura 4.8:</b> Análise da especificidade do teste de ELISA para o vírus 17D.....	43
<b>Figura 4.9:</b> Análise do teste de ELISA para o vírus 17DD cultivado em ovo embrionado ou em cultura de células Vero.....	44
<b>Figura 4.10:</b> Cinética de redução da infecciosidade do vírus 17DD por formaldeído.....	45
<b>Figura 4.11:</b> Detecção do vírus 17DD inativado por formaldeído produzido em célula Vero com meio 199 Earle's e com soro fetal bovino e em meio VP SFM AGT™ sem soro pelo ELISA.....	45

## RESUMO

O vírus atenuado da febre amarela, subcepa 17DD, é utilizado por Bio-Manguinhos para a produção da vacina contra a febre amarela. Esta vacina tem sido utilizada para a imunização humana com um excelente histórico de eficácia e segurança. Entretanto, nos últimos anos, devido à ocorrência de alguns casos de eventos adversos associados ao vírus vacinal cepa 17D e subcepa 17DD, apontou-se a necessidade de desenvolvimento de uma vacina inativada. Para a implementação desta nova vacina torna-se necessário o desenvolvimento de métodos de quantificação de antígenos virais. Diferentes metodologias de quantificação podem ser utilizadas na produção de vacinas inativadas, sendo as mais comuns o teste imunoenzimático (ELISA) e o teste de dose-resposta. O presente estudo teve como objetivo o estabelecimento de um ELISA visando à detecção do antígeno do vírus da febre amarela inativado. Para este propósito, foram obtidos estoques de partículas virais da subcepa 17DD, a partir de culturas de células Vero, os quais foram purificados e quantificados por métodos bioquímicos e virológicos clássicos, respectivamente. Para o desenvolvimento do teste utilizamos diferentes anticorpos como captura na fase sólida. Os resultados obtidos para os testes utilizando o anticorpo 2D12 como captura mostraram um limite de detecção do antígeno no ELISA foi de  $2,21 \log_{10}$  PFU/0,1mL e (1,55  $\mu$ g/0,1mL). A partir deste valor, foi estabelecido um controle positivo contendo o vírus 17DD atenuado com título de  $3,06 \log_{10}$  PFU/mL e (29 $\mu$ g/0,1mL). Os resultados mostram, também, que o ELISA foi capaz de detectar o vírus 17DD inativado por formaldeído até a diluição 1:16 (52,9  $\mu$ g/0,1mL). Baseado nos resultados obtidos acredita-se que o desenvolvimento de um teste de ELISA para detecção e quantificação do antígeno 17DD possa representar um importante avanço tecnológico no controle da produção de uma vacina inativada contra a febre amarela.



## ABSTRACT

The attenuated 17DD substrain of yellow fever virus is used in Bio-Manguinhos for yellow fever vaccine production. This vaccine has been used for human immunization with an excellent history of efficacy and safety. However, in the latest years, the occurrence of adverse events associated with 17D and 17DD substrain pointed to the necessity of developing technologies for the production of an inactivated vaccine. The implementation of this new vaccine will require methods for antigen quantification. Different methodologies of quantification can be used, being the most commonly used the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and dose response test. The aim of this study was the establishment of an ELISA for the detection of inactivated yellow fever virus antigen. For this purpose, 17DD virus was obtained from Vero cell cultures, purified and quantified by biochemical and virological classical methods, respectively. The results showed that ELISA test using the 2D12 capture antibody presented a limit of 2,21 log<sub>10</sub> PFU/0.1mL of viral titer and (1,55 µg viral protein/0.1mL). Based on this value, a positive control was established which contained the attenuated 17DD substrain of yellow fever virus with a titer of 2,95log<sub>10</sub> PFU/mL and (29 µg/0.1mL). The results also showed that the ELISA was able to detect 17DD virus inactivated by formaldehyde up the dilution 1:16 (52,9 µg protein/0,1mL). The development of an ELISA test for the detection and quantification of 17DD antigen can represent an important step in the production control of the inactivated vaccine against of yellow fever.

## 1. INTRODUÇÃO

---

A Febre Amarela, uma doença transmitida por artrópode, é uma importante causa de alta morbidade e letalidade em vastas regiões tropicais da América do Sul e da África. No século XVII, essa doença dizimou milhares de vidas em extensas epidemias urbanas nesses dois continentes. Apesar da existência de uma vacina eficaz contra a febre amarela, essa doença ainda se destaca como um problema de Saúde Pública em vários países do mundo, especialmente, nos países tropicais, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação dos principais mosquitos vetores (Monath, 1991; Monath, 2005). Desde o final da década de 1930, a vacina contra a febre amarela é a única vacina, contendo flavivírus atenuados, licenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Estima-se que mais de 400 milhões de doses, utilizando a subcepa 17DD, tenham sido produzidas no Brasil até o ano de 2006 (WHO, 2005a; PAHO, 2005; FUNASA, 2006). A eficácia da vacina tem justificado a sua produção em larga escala, sendo o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), atualmente, o maior produtor da vacina contra a febre amarela no mundo.

Nos últimos anos, devido à ocorrência de alguns casos apresentando eventos adversos associados ao vírus vacinal da febre amarela, cepa 17D e subcepa 17DD (Galler *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2001; Struchiner *et al.*, 2004; OMS, 2004; Monath, 2005) aponta-se à necessidade de desenvolvimento de novas metodologias para a produção de uma vacina inativada contra esse vírus. Um dos grandes problemas para a implementação de metodologias de inativação, de modo geral, é a dificuldade de quantificação “*in vitro*” do vírus inativado presente nesse tipo de vacina.

Atualmente, são conhecidos alguns procedimentos estabelecidos para quantificação viral em vacinas comerciais, como por exemplo, as vacinas inativadas contra os vírus da poliomielite (Carol *et al.*, 1989; Eugenia *et al.*, 2004) da hepatite A (Armstrong *et al.*, 1993), da raiva (Rooijackers *et al.*, 1996; Fournier-Caruana *et al.*, 2003), da encefalite japonesa (Sugawara *et al.*, 2002) e da doença de “Newcastle” (Maas *et al.*, 2002; Claassen *et al.*, 2003; Claassen *et al.*, 2004). Esses procedimentos, de modo geral, são baseados na utilização de ensaios imunoenzimáticos e ensaios de dose-resposta. Nesta tese, foi desenvolvido um teste imunoenzimático (ELISA) capaz de detectar como antígeno o vírus inativado da febre amarela, subcepa 17DD.

## 1.1- A origem da febre amarela

Não se sabe se a febre amarela já existia no Novo Mundo antes das viagens de Colombo à América. Porém, muitas evidências levam a crer que tenha sido introduzida na América por intermédio dos navios que realizavam o tráfico de escravos. Além disso, presume-se que a epidemia febril que atacou os conquistadores espanhóis na península de Yucatan, em 1648, tenha sido o primeiro registro da doença febre amarela. Deste modo, durante os séculos XVIII e XIX e início do século XX “...a febre amarela foi o maior flagelo das regiões tropicais, fazendo inúmeras vítimas nas regiões de zonas temperadas dos hemisférios boreal e austral, de tal modo, que não existiu região no continente americano, que não tenha sido afetada, desde o sul, da Argentina ao Chile, até o norte, no Canadá” (Soper, 1942).

A febre amarela afetou, principalmente, imigrantes europeus recém-chegados. Um exemplo disto foi, no início do século XIX, uma grande epidemia que dizimou as expedições francesas enviadas ao Haiti para controlar uma rebelião. No Caribe, foram descritas 83 epidemias no período de 1620 a 1900. Nos arredores de Havana (Cuba), o “vírus permaneceu em atividade” desde 1762 até o início deste século, quando Gorgas conduziu a erradicação do vetor (Gorgas, 1924).

Nos Estados Unidos, era freqüente a ocorrência de casos da doença na costa do Golfo do México. Em 1905, foi registrado em Nova Orleans o último caso autóctone de febre amarela naquele país (Monath, 1999).

Por muitos anos, acreditou-se que a transmissão da febre amarela ocorria pelos miasmas (contaminação pelo ar) e, conseqüentemente, na transmissão da doença nos navios negreiros. Em 1848, Josiah Clark Nott sugeriu que a febre amarela poderia ser transmitida por mosquitos. Mas o divulgador, desta idéia foi o médico francês Louis Daniel Beauperthuy que, em 23 de maio de 1854, relatou os fatos relacionados com a transmissão da febre amarela, em artigo publicado na, “Gazeta Oficial de Cumaná”, Venezuela (WHO, 2005a). Quase três décadas após, em 1881, Carlos Finlay, apoiado em várias observações defendeu a mesma teoria, apontando o mosquito *Stegomyia fasciata*, hoje conhecido como *Aedes aegypti*, como causador da febre amarela (Finlay, 1881). Após a demonstração experimental, em 1901, pela Comissão Reed em Havana de que a febre amarela podia ser transmitida de uma pessoa a outra pelo mosquito *Aedes aegypti*, ficou comprovada a teoria de Finlay (Chiong, 1989).

A divulgação da descoberta desencadeou uma série de campanhas contra o mosquito nos lugares onde a febre amarela era considerada um problema de Saúde Pública. Em Havana, Panamá, Santos, Rio de Janeiro, Equador, Peru, Colômbia, América Central, México e outros centros urbanos foram adotadas medidas de controle contra esse mosquito. Como resultado dessas campanhas, ocorreu o desaparecimento da doença em vastas zonas tropicais americanas. Os últimos casos urbanos na região das Américas ocorreram em 1954, em Trinidad. Mais recentemente, em 1997, foram relatados seis casos em Santa Cruz de la Sierra, Bolívia, porém, não reconhecidos oficialmente pelo governo boliviano (Benchimol, 2001).

A febre amarela continua confinada às matas das bacias dos rios Amazonas, Orinoco, Catatumbo, Atrato e Madalena, onde afeta pessoas não imunes. Na América do Sul, sete países notificaram casos nos últimos 14 anos: Bolívia, Brasil, Colômbia, Guiana Francesa, Equador, Peru e Venezuela. Nesse período de 1990 a 2003 foram registrados 2.457 casos, com 1.196 óbitos e letalidade de 48,7% (Vasconcelos *et al.*, 2004).

A febre amarela foi a primeira doença a ter a sua etiopatogenia caracterizada e a terceira, após a varíola e a raiva, a utilizar a imunização vacinal (Barret, 1987). Desde a sua identificação, em 1927, o vírus da febre amarela tem se apresentado como um grande desafio epidemiológico (Monath, 2005). Na década de 1986-1995, ocorreu um aumento dramático na incidência da febre amarela demonstrado pelo aumento do número de casos relatados. Durante este intervalo, um total de 24.753 casos e 6.594 mortes foram oficialmente notificadas à OMS. Posteriormente, epidemias continuaram a ocorrer, regularmente, e entre os anos de 2000 a 2004, 16 países reportaram uma ou mais epidemias. Segundo dados da OMS, a incidência real, no mundo, tem sido estimada em 200.000 casos por ano (WHO, 2005a).

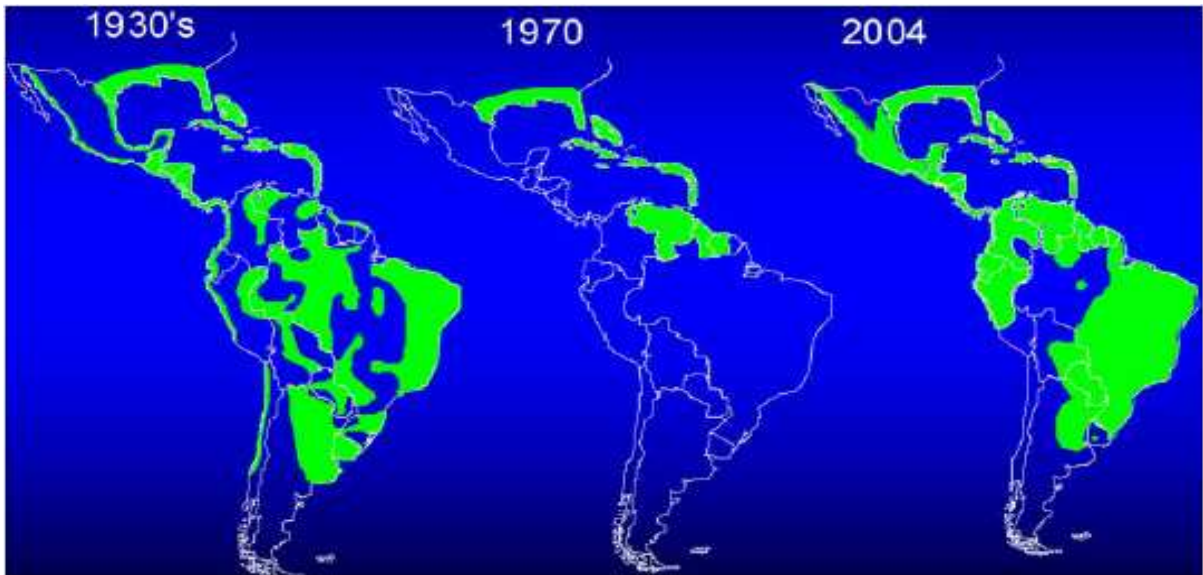
Dois ciclos de transmissão da febre amarela são conhecidos: a febre amarela urbana ou clássica e a febre amarela silvestre. No ciclo urbano, a febre amarela é transmitida ao homem pelo mosquito doméstico *Aedes*, principalmente, o *Aedes aegypti*, que se reproduz em águas limpas acumuladas em localidades urbanas. Quando o mosquito é infectado pelo vírus, são necessários 12 a 14 dias para que ele comece a transmitir o vírus para o homem. Já a febre amarela silvestre é uma doença endêmica em macacos, transmitida por mosquitos *Aedes*, *Haemagogus* e *Sabethes*, que habitam as florestas úmidas. A infecção nestes animais pode ser inaparente ou grave. A forma silvestre da doença tem sido objeto de intervenções por meio do controle dos mosquitos vetores (Gubler, 2004; Monath, 2005).

Nas últimas décadas, o aumento da densidade e da distribuição dos mosquitos vetores e o aumento no número de pessoas que circulam em áreas de floresta são os principais responsáveis pelo aumento do risco de epidemias urbanas na América do Sul (WHO, 2005a).

Esses fatores, somados à existência de um ciclo de transmissão silvestre tornam a erradicação total da febre amarela um alvo difícil de ser atingido (WHO, 1998, 2000, 2005a). Os grandes investimentos em infra-estrutura urbana, realizados nas primeiras décadas do século XX, e as medidas de combate ao vetor, realizadas em função das epidemias de febre amarela urbana, reduziram drasticamente a ocorrência de casos (WHO, 2003, 2004).

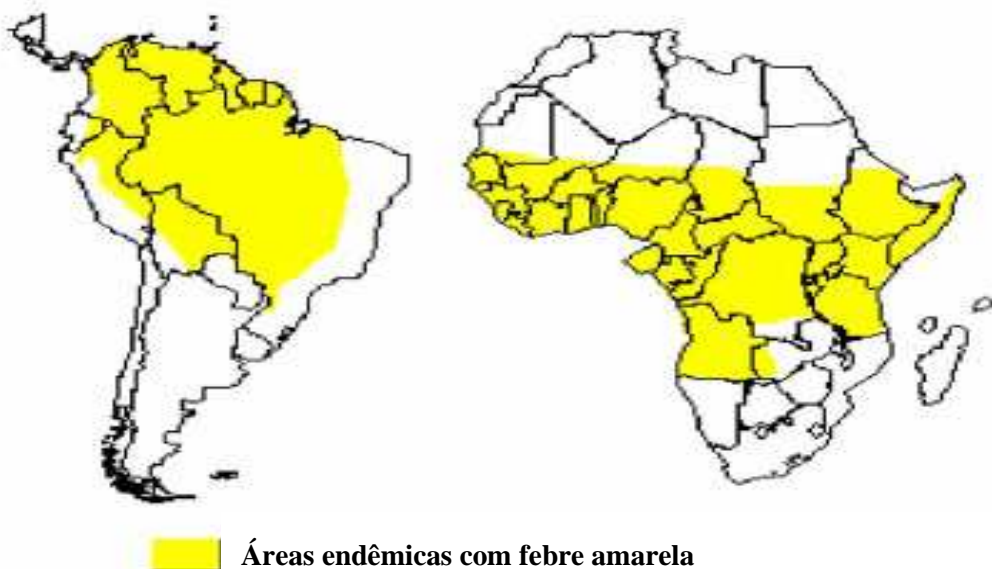
## **1.2- A febre amarela no Brasil e nas Américas**

No Brasil, as espécies *Haemagogus janthinomys* e *Aedes aegypti* se destacam na manutenção do vírus na natureza e na transmissão da forma urbana da doença, respectivamente. A primeira epidemia de febre amarela descrita no Brasil ocorreu em Recife, Pernambuco, em 1685. Já no início do século XX, a doença era endêmica em centros urbanos. A última epidemia em um grande centro urbano ocorreu no Rio de Janeiro em 1928-1929, onde foram registrados 738 casos, com 435 óbitos. Com as campanhas de combate ao vetor urbano e uso da vacina foi possível controlar a forma urbana da febre amarela, que teve o seu último caso notificado em 1942, no município de Sena Madureira no Acre (Franco, 1969, Vasconcelos *et al.*, 2004). No final da década de 50, o Brasil foi considerado livre do vetor urbano junto com outros países sul americanos, porém no ano de 1967, ocorreu uma reinfestação do mosquito no estado do Pará, controlada apenas em 1972 (Frahia Neto, 1967). Posteriormente, em 1977 e no ano seguinte, ocorreu uma reinfestação nos estados da Bahia e no Rio de Janeiro. O mesmo fato ocorreu em países da América do Norte e Central. Atualmente, existe uma grande preocupação das instituições públicas de saúde como a reurbanização da febre amarela no Brasil, uma vez que o mosquito vetor está presente em áreas urbanas (Benchimol, 2001; Gubler, 2004). A ilustração abaixo demonstra o avanço do mosquito *Aedes aegypti* no Brasil e nas Américas nas últimas décadas (Figura 1.1).



**Figura 1.1:** *Distribuição geográfica do Aedes aegypti nas Américas.* As áreas endêmicas do *Aedes aegypti* estão assinaladas com a cor verde mostrando o perfil de distribuição do mosquito *Aedes aegypti* nos anos de 1930, 1970 e 2004 (adaptado de Gubler, 2004).

Principalmente, em função da presença dos mosquitos vetores e das condições para a sua proliferação, a febre amarela é endêmica na África e na América do Sul causando 30.000 mortes por ano (Robertson, 1993; WHO, 1998; WHO, 2005a; 2005b). Segundo a OMS, 90 % desses casos ocorrem em 33 países do Continente Africano, com população de 468 milhões, que estão sob risco de contrair infecção pelo vírus da febre amarela (WHO, 1998; WHO, 2004; PAHO, 2005) (Figura 1.2).



**Figura 1.2:** *Distribuição global da febre amarela.* As áreas endêmicas de febre amarela estão destacadas com a cor amarela (Gubler, 2004).

O Brasil é o país que possui a maior área endêmica de febre amarela silvestre no mundo, seguida pela bacia do rio Congo, na África (Tauil, 2001, Gubler, 2004). A área endêmica inclui 12 estados, sendo eles: Acre, Amazonas, Amapá, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Nestes estados, estão presentes todos os elos da cadeia de transmissão. A circulação viral ocorre todos os anos e depende de vários fatores: grau de cobertura vacinal da população, taxa de infecção dos mosquitos transmissores, imunidade da população de macacos ao vírus amarílico e alterações ambientais (especialmente aumento de intensidade das chuvas). Alguns municípios dos estados da Bahia, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo são considerados áreas de transição. A epizootia estende-se, ainda, aos estados de Minas Gerais e Paraná. Estes estados, considerados “zona epizoótica” de transição são habitados por 19,4 milhões de pessoas. Em função da última epidemia ocorrida em Minas Gerais, no ano de 2003, foi definida uma área indene e outra de risco potencial para circulação viral (SVS/MS, 2005; Buss *et al.*, 2005) (Figura 1.3).



**Figura 1.3: Regiões onde a febre amarela é endêmica no Brasil.** Áreas de risco para febre amarela silvestre. A Área endêmica está assinalada em verde, área de transição em vermelho, área indene em azul e área de risco potencial em amarelo. Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde (<http://www.Saude.gov.br/portal/svs/default.cfm>; Novembro de 2006).

No período de 1990 a 1993, os números de casos de febre amarela, registrados no Brasil, oscilaram entre 2 e 83, todos oriundos da região Norte, Centro-Oeste e Nordeste (Estado do Maranhão). Somente no ano de 2000, 85 casos da doença foram confirmados resultando em 40 óbitos. A ocorrência de surtos em 2001 e 2003 em regiões rurais de Minas Gerais inseriu as regiões Leste e Sudeste do país no contexto de expansão da febre amarela silvestre. Neste período, também foram descritos casos nos estados de São Paulo, Bahia e Distrito Federal. Segundo dados do Ministério da Saúde, na década de 90 a letalidade da doença variou entre 28% e 100%. Essas estatísticas subestimam a magnitude do problema e revelam limitações na vigilância epidemiológica da febre amarela (Vasconcelos *et al.*, 2004). Em razão da dificuldade de detectar formas clínicas mais brandas, foram adotadas novas ações de intensificação da vigilância epidemiológica, com especial atenção para a vigilância de epizootias entre primatas não-humanos nas florestas brasileiras, considerando sua importância como “animal sentinela” para identificar a circulação do vírus, e assim, prevenir a ocorrência de casos humanos. Aliado a tudo isso, tem sido recomendada a adoção da vigilância das doenças febris, que apresentem icterícia e hemorragia, com a finalidade de melhorar a sensibilidade da detecção de casos de febre amarela, bem como das doenças que exigem diagnóstico diferencial. Em 2003, foram registrados 64 casos da doença, com 23 óbitos. O surto de Minas Gerais foi responsável por 58 desse total de casos e por 75% de todos os óbitos do período (21 óbitos). Os demais casos de febre amarela foram registrados em Mato Grosso (n= 5) e Pará (n= 1) (SVS/MS, 2005).

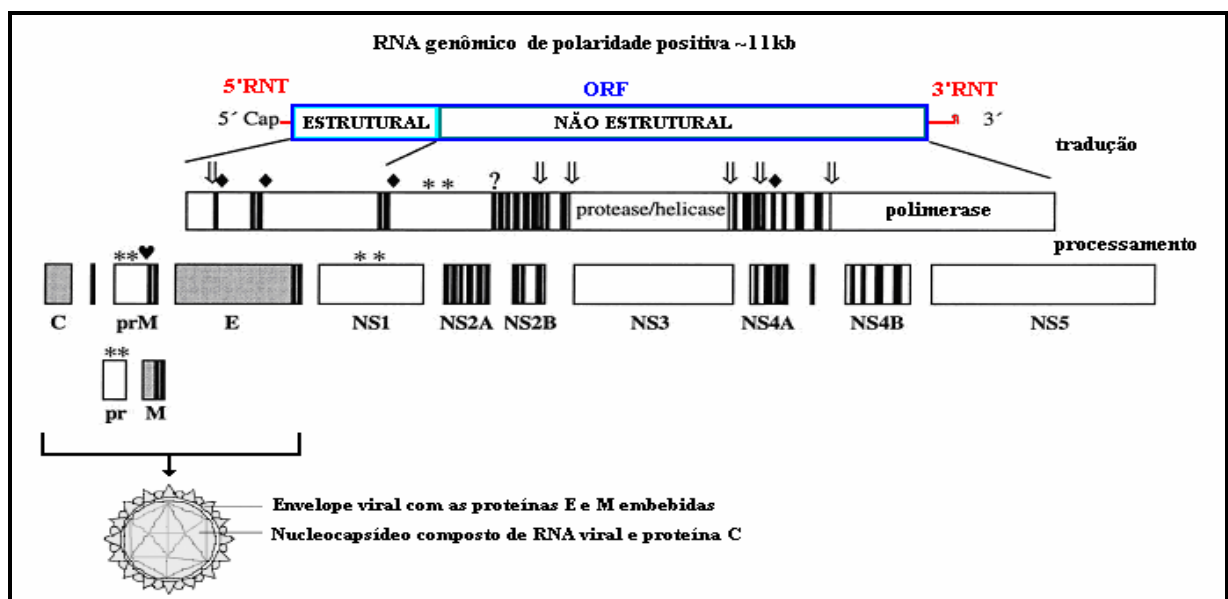
### **1.3- Características gerais do vírus da febre amarela**

O vírus da febre amarela é o protótipo do gênero flavivírus da família *Flaviviridae* e inclui, aproximadamente, 70 vírus. Os flavivírus possuem cerca de 40-60 nm de diâmetro, envelope e genoma RNA de fita simples. São classificados como arbovírus por serem transmitidos por vetores artrópodes, como mosquitos ou carrapatos (Burke & Monath, 2001).

A família *Flaviviridae* inclui três gêneros: Flavivírus, Hepacivírus e Pestivírus. Os flavivírus possuem como principais representantes os vírus da febre amarela, da dengue e da encefalite japonesa. O gênero Hepacivírus é representado pelo vírus da hepatite C e o pestivírus pelo vírus que causa a diarréia bovina. Embora pertençam a diferentes gêneros e possuam propriedades biológicas distintas, os vírus dos 3 gêneros compartilham grande semelhança na morfologia viral, na organização genômica e na estratégia de replicação (Rice, 1996).



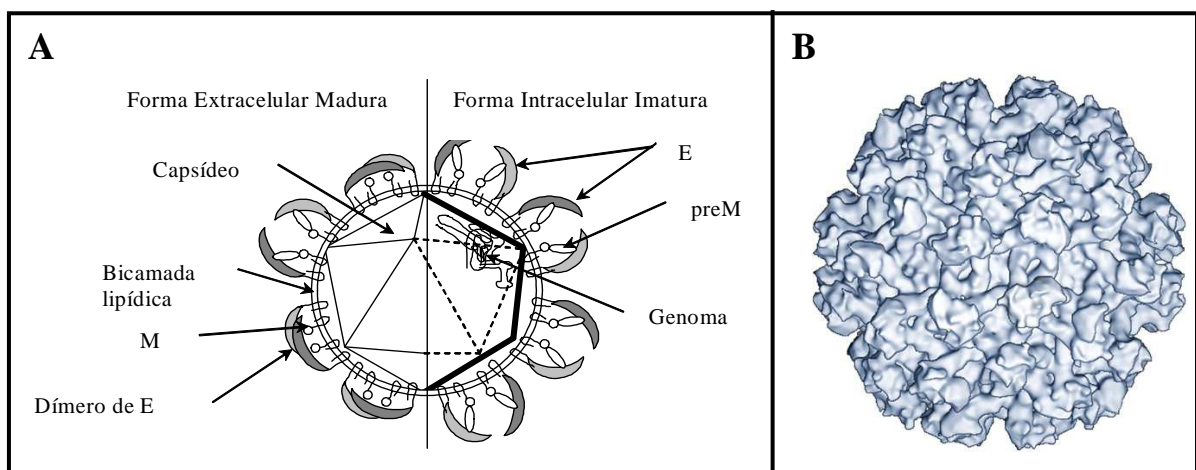
O vírus da febre amarela tem um genoma constituído por uma única molécula de RNA contendo 10.862 nucleotídeos (nt), uma estrutura de CAP no seu lado 5' não traduzido (118 nt) e uma extremidade 3' não adenilada (511 nt) (figura 1.4). Estes dados foram obtidos a partir do seqüenciamento nucleotídico do vírus vacinal 17D-204 (Rice *et al.*, 1985). O RNA, que apresenta polaridade positiva, funciona como RNA mensageiro participando da tradução de uma poliproteína precursora de 3.411 aminoácidos. Esta poliproteína ao ser processada proteoliticamente, gera 10 polipeptídeos: 3 relacionados as proteínas estruturais e 7 relacionados as proteínas não estruturais. As proteínas estruturais foram denominadas como: proteína C do capsídeo (12-14 kDa), proteína M de membrana e o seu precursor prM e proteína E do envelope. Os genes que codificam as proteínas estruturais encontram-se no primeiro quarto do genoma. A região do genoma que codifica as proteínas não-estruturais (NS) estão numeradas de 1 a 5 (NS1 a NS5), de acordo com a ordem de síntese (Rice *et al.*, 1985) (Figura 1.4).



**Figura 1.4: Esquema da organização genômica dos flavivírus.** O genoma está representado na parte superior, com a indicação das seqüências 5' e 3' não-traduzidas e a fase de leitura aberta de 10.862 nucleotídeos. Nesta fase de leitura estão codificadas, no sentido 5' → 3', as três proteínas estruturais (C, prM e E) e os sete genes para as proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). As setas indicam os sítios de clivagens proteolíticas efetuadas pela protease viral (NS2B/NS3) e os losangos, as clivagens pela signalase celular (modificado de Chambers *et al.*, 1990a).

A estrutura dos flavivírus é bastante conhecida e, nos últimos anos, tem sido caracterizada com detalhes (Ferlenghi *et al.*, 2001; Kielian, 2002; Kuhn *et al.*, 2002; Mukhopadhyay *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Heather, 2005). Em termos gerais, essa

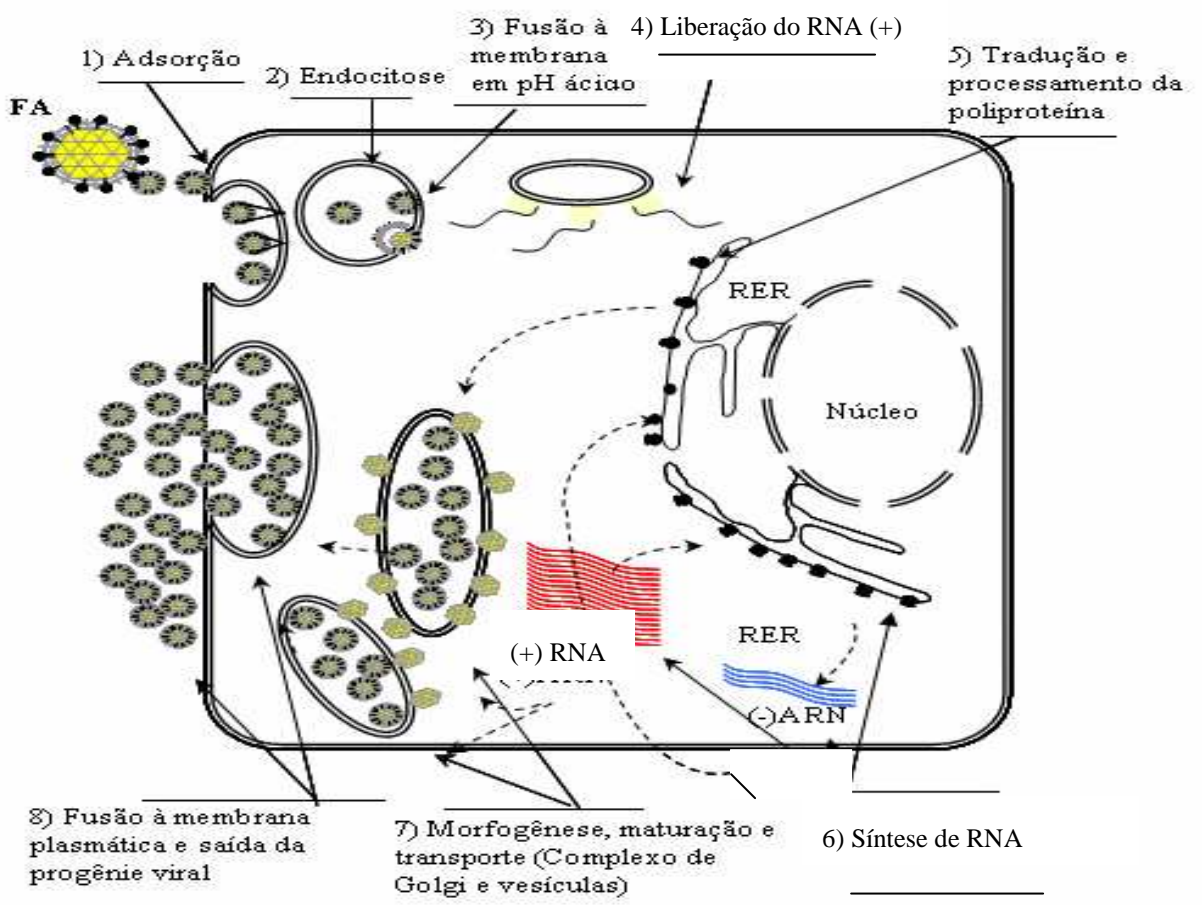
estrutura é composta por um nucleocapsídeo e um envelope viral. O nucleocapsídeo apresenta simetria icosaédrica. O envelope viral, por sua vez, é composto pelas proteínas estruturais; M e E. Nos *virions* imaturos, a proteína M está sob a forma de um precursor denominado preM ou prM. O precursor preM é uma proteína glicosilada de, aproximadamente, 22 kDa. Uma clivagem proteolítica durante a maturação viral originará a proteína M, com 8 kDa. A glicoproteína E, a principal da estrutura do envelope viral, tem, aproximadamente, 55 kDa, e é a responsável pela ligação à receptores glicoprotéicos na superfície celular. Esta proteína desempenha papel chave nos processos de infecção celular, no tropismo viral e na virulência. Além disso, possui múltiplos determinantes antigênicos, sendo o principal alvo de resposta imune no hospedeiro vertebrado. A Figura 1.5 mostra um esquema geral das partículas virais imaturas (forma intracelular) e maduras (forma extracelular) (Figura 1.5A) e a forma imatura da estrutura do vírus da febre amarela (17D), recentemente obtida por criomicroscopia eletrônica (Figura 1.5B) (Chambers *et al.*, 1990a; Chambers *et al.*, 1990b; Heather, 2005).



**Figura 1.5: Organização estrutural dos flavivírus.** (A) Representação esquemática da partícula viral em suas formas intracelular imatura e extracelular madura: o capsídeo do vírus tem a simetria icosaédrica. Estão representadas as proteínas de envelope (E) e a sua forma dimérica, a proteína de membrana (M) e seu precursor (preM), ainda presente no envelope na forma extracelular. Ao contrário das partículas extracelulares, as partículas intracelulares não são infecciosas (modificado e traduzido de Chambers *et al.*, 1990a). (B) Imagem de uma criomicroscopia eletrônica obtida por meio de reconstrução de imagem de uma partícula imatura do vírus da febre amarela 17D (Heather, 2005).

No estágio inicial do ciclo infeccioso do vírus, na célula alvo, a proteína E possui um papel fundamental. A ligação da proteína E a receptores celulares induz à formação de vesículas endocíticas. Após a internalização do vírus, por endocitose mediada por receptor, os nucleocapsídeos são liberados no citoplasma por meio da fusão da membrana do endossoma com a membrana do envelope viral. Processo este, induzido pela redução de pH que ocorre no

interior das vesículas endocíticas, capaz de causar modificações estruturais na proteína E de envelope levando à exposição de um peptídeo de fusão (Allison *et al.*, 1995; 2001). Estas alterações causam a trimerização da proteína E (Stiasny *et al.*, 1996). No citoplasma da célula hospedeira, o genoma de RNA serve como mRNA para a tradução das proteínas estruturais e não-estruturais. A formação das partículas virais ocorre pelo processo de brotamento onde o núcleocapsídeo, ancorado na membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER), é envolvido pelo envelope viral. As partículas virais são transportadas em vesículas para a membrana plasmática e são liberadas por exocitose pelo sistema de Golgi (Figura 1.6).



**Figura 1.6: Esquema do ciclo infeccioso dos flavivírus.** As legendas numeradas de 1 a 8 indicam as etapas sucessivas do processo de infecção viral (Adaptado de Rice, 1996).

## **1.4- A vacina contra a febre amarela**

Em 1928, Edward Hindle descreveu a primeira vacina experimental utilizando vírus selvagem presente em macerados de fígado de macaco (Soper, 1937). A suscetibilidade de camundongos e de macacos rhesus (*Macaca mulatta*) ao vírus da febre amarela foi um fator decisivo para as primeiras tentativas bem sucedidas para produzir uma vacina de vírus vivo (Benchimol, 2001). Em 1927, No Instituto Pasteur, em Dakar, foi desenvolvida a cepa neurotrópica francesa, pela propagação seriada com mais de 200 passagens, em cérebro de camundongo (Sawyer *et al.*, 1930).

A cepa vacinal 17D foi desenvolvida a partir do vírus da febre amarela isolado de um africano chamado Asibi. Após 53 passagens do vírus em macacos rhesus, com períodos intermitentes em *Aedes aegypti*, o vírus foi propagado em tecido embrionário de camundongos (Lloyd *et al.*, 1936). A 18ª cultura de tecido embrionário de camundongo foi transferida para cultura de embrião de galinha onde sofreu 58 passagens. Em seguida, foi submetida a outras 160 subculturas de embrião de galinha.

Posteriormente, Theiler e Smith realizaram subculturas do vírus 17D em embrião de galinha, partindo da cepa 17D (Theiler e Smith, 1937a). Na subcultura 114, relataram a atenuação do viscerotropismo e neurotropismo nos testes que utilizavam macacos suscetíveis (Theiler e Smith, 1937a). Estes mesmos pesquisadores utilizaram as subculturas 227 e 229 do vírus 17D para imunizar, com sucesso, oito norte-americanos (Theiler & Smith, 1937b). Deste modo, a primeira produção da vacina contra febre amarela utilizando a cepa 17D, foi registrada em 3 de fevereiro de 1937 (Post, 1996).

### **1.4.1- A vacina no Brasil**

No Brasil, desde 1929, a técnica de Hindle, constituída por macerados hepáticos humanos formalizados e fenolizados, era utilizada no preparo da primeira vacina contra a febre amarela. Essa vacina foi utilizada em 25.000 pessoas no Brasil (Soper, 1937). Provou-se, posteriormente, sua ineficácia em consequência de infecções intercorrentes e inúmeros óbitos.

Em 1930, Sawyer *et al.* iniciaram o emprego do vírus neurotrópico francês associado ao soro humano imune (Sawyer *et al.*, 1931). Foram imunizados apenas 34 brasileiros porque a ocorrência de encefalite pós-vacinal em macacos vacinados com a cepa neurotrópica apontou um risco para a imunização do homem. Posteriormente, em janeiro de 1937, o Dr.

Hugh Smith trouxe para o Brasil a amostra viral, denominada 17D. Em fevereiro e março, do mesmo ano, mais 33 voluntários foram vacinados com lotes da vacina formulada com a adição de soro humano (Smith *et al.*, 1938). Os primeiros lotes da vacina, identificados nos livros de registros do laboratório de produção da vacina contra febre amarela, em Bio-manguinhos, foram inoculados no dia 19 de março e no dia 3 de agosto de 1937, com vírus das subculturas 236, 237 e 238 da amostra 17DD. Em junho deste mesmo ano, um grupo maior com 289 indivíduos foi vacinado na área rural do estado de Minas Gerais, em uma campanha que continuou até o final de 1937, acumulando um número de 38.266 vacinados (Post *et al.*, 2001). Até o final da década de 40, todas as vacinas produzidas no Brasil foram constituídas de vírus 17DD contendo soro humano. Porém, devido ao aparecimento de icterícia (hepatite B) em pessoas vacinadas, a formulação das vacinas foi modificada e a adição de soro humano foi abolida do protocolo original. Posteriormente, outras alterações nos procedimentos de produção foram realizadas, incluindo preparação do inóculo e lotes vacinais exclusivamente em embriões de galinha e o desenvolvimento do sistema de lote semente.

Várias subculturas do vírus 17D foram testadas durante o período de 1937 à 1942 no Brasil. A substituição de uma cepa vacinal por outra ocorreu de acordo com os resultados obtidos no processo de produção e controle de qualidade por intermédio da inoculação em macacos e testes clínicos em humanos. Amostras denominadas: 17D-Rio, 17D "low"-Rio, 17D2-Rio, 17D3-Rio, 17D NY 102, 17D NY 104, 17D NY 318, 17D NY 310, 17DD "high", 17DD "low", 17DD1-8, 17DD EP "high" foram testadas, até que a amostra 17DD EP-"low" foi selecionada, originando o vírus semente utilizado até os dias de hoje na produção desta vacina por Bio-Manguinhos. Os vírus resultantes destas passagens foram utilizados para a produção de vacinas e imunização humana em diferentes escalas (Post *et al.*, 2001). As subcepas 17D-204 e 17DD EP foram as que permaneceram em uso no mundo para a produção da vacina devido a fatores como atenuação para primatas humanos e não-humanos, assim como imunogenicidade (Post *et al.*, 2001) (Quadro 1.1).

**Quadro 1.1: Produtores mundiais da vacina contra febre amarela (Monath, 2005).**

\*Administração de alimentos e drogas do termo em inglês “Food and Drug Administration” (FDA).

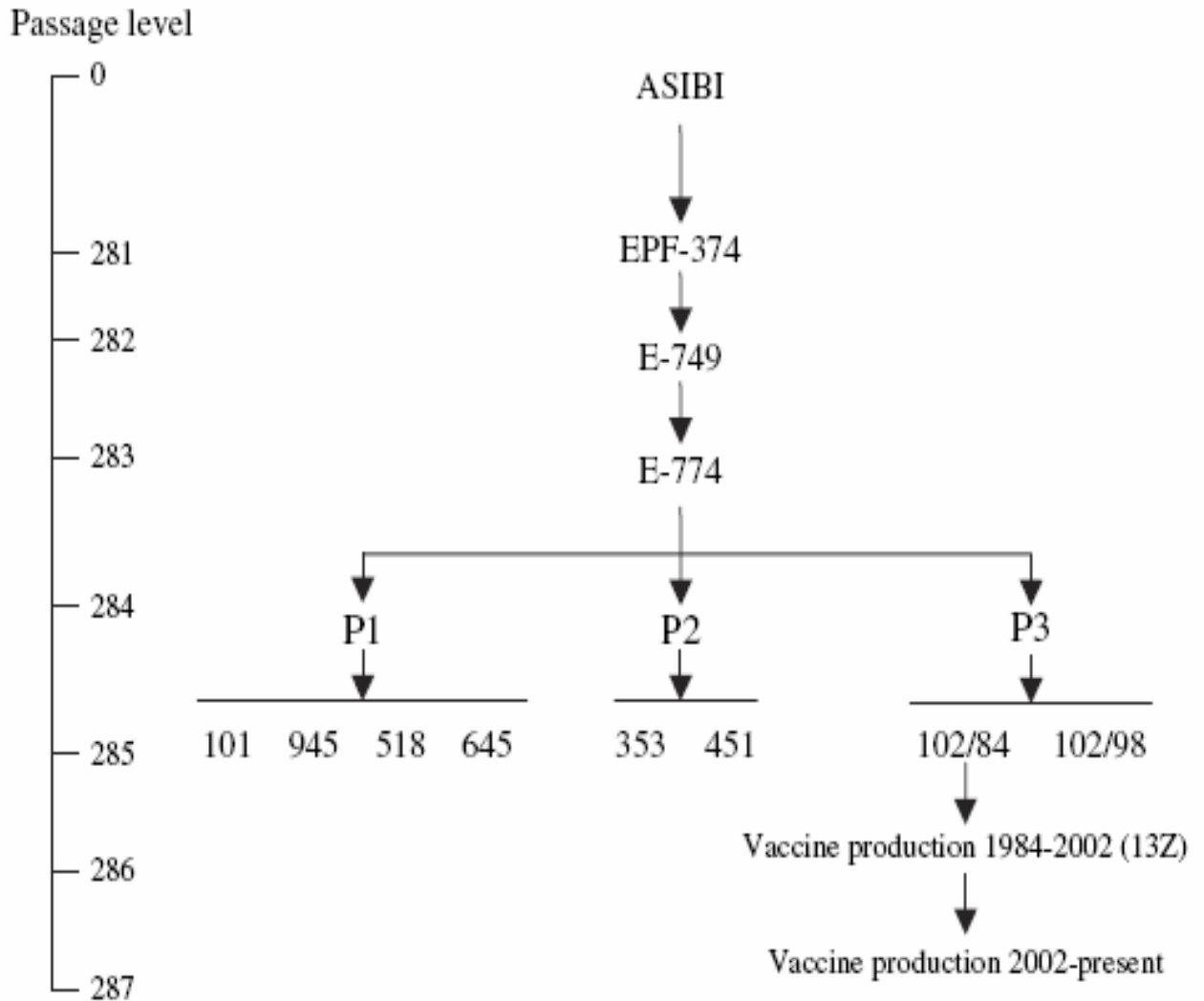
País	Cepa utilizada	Produtor	Qualificado pela OMS	Comentários gerais
Brasil	17DD	Bio-Manguinhos	Sim	
EUA	17D-204	Sanofi Pasteur Swiftwater PA	Não	Principalmente consumo nos USA, aprovado pelo FDA*
Inglaterra	17D-204	Chiron vaccines, Speke	Sim	
França	17D-204	Sanofi Pasteur, Marcy	Sim	
Colômbia	17D-204	Inst. Nacional de Saúde - Bogota	Não	Consumo Local
Rússia	17D-204	Inst. Poliomielite e Encefalite Viral - Moscow	Não	Consumo Local
Senegal	17D-204	Inst. Pasteur - Dakar	Sim	
Suíça	17D-204	Berna	Não	Fabricação prévia pelo Inst. Robert Koch

A amostra 17D foi trazida para o Brasil com a vacina denominada NY41, correspondente à 230<sup>a</sup> subcultura da subamostra 17D. Esta amostra foi usada para preparar o inóculo a partir do cultivo de tecido embrionário de galinha sem tecido nervoso até a passagem 519. Diferentes lotes, com número de passagens diferentes foram utilizados na produção da vacina até julho de 1939 (Post *et al.*, 2001). A observação de Penna e Moussatché (1939), de que passagens em ovos embrionários aumentavam o rendimento no título viral, levou a novos cultivos da subamostra 17DD. Um dos cultivos iniciou-se com subculturas com nível de passagem mais baixo (sc 243) e foi passado, seriadamente, em ovos embrionados, até a 150<sup>a</sup> passagem. Esta série foi denominada passagem em ovos do termo em inglês “*egg passage*” (EP) e, posteriormente, dividida em EP baixo do termo em inglês “*low*” (níveis de passagem entre 35 e 40) e EP alto do termo em inglês “*high*” (75 a 150). Em 13 de janeiro de 1939, cinco macacos rhesus foram inoculados com a vacina EPF347 (EP38). Neste experimento, foi detectada viremia em três dos cinco animais inoculados, e após um período de observação de 30 dias, nenhum dos macacos apresentou sinais de comprometimento do sistema nervoso. Neste período, 40 doses da vacina haviam sido utilizadas para imunização humana. Após os resultados satisfatórios com a vacina EPF347, no início de setembro de 1939, Penna e colaboradores, continuando os trabalhos com a série EP, vacinaram 48 indivíduos no Rio de Janeiro com o lote EP537 (EP41) (Post *et al.*, 2001). Os resultados, mais uma vez, foram satisfatórios sugerindo aos pesquisadores que esta série era ainda menos

reatogênica que os outros lotes de vacinas testados. O lote de vacina EP347 foi utilizado para produzir o lote E749, que por sua vez, gerou o lote E774. A amostra E774, que corresponde à amostra 17DD “low” com 40 passagens seriadas em ovos embrionados foi utilizada para o preparo dos lotes semente (Post *et al.*, 2001).

A adoção do sistema de lote semente na produção da vacina contra febre amarela utilizando a subcepa EP data de 1944 (Nicolau, 1988). O lote semente foi constituído de um lote principal, dando origem a vários lotes primários e secundários, os quais serviram como fonte de vírus para a produção de vacina até 2001. Posteriormente, o lote semente secundário 102/84 deu origem ao lote 993FB013Z. Em 1961, o processo de inoculação de ovos embrionados foi alterado; a inoculação passou a ser feita na cavidade vitelina, reduzindo o índice de mortalidade dos ovos embrionados. Em 1982, foi introduzido o uso de ovos livres de patógenos específicos do termo em inglês “*specific pathogen free*” (SPF) na produção da vacina, o que proporcionou a redução do risco de contaminações com agentes adventícios. Em seguida, foram adicionadas substâncias estabilizadoras na formulação da vacina o que aumentou a termoestabilidade da mesma (Nicolau, 1988).

Atualmente, Bio-Manguinhos é o maior produtor mundial da vacina contra a febre amarela, com quase 400 milhões de doses produzidas, desde 1985, e é o único produtor a utilizar a cepa 17DD. No Brasil, de 1937 a 2000, foram vacinados, aproximadamente, 200 milhões de pessoas com a cepa 17DD do vírus da febre amarela. Na Figura 1.7 visualiza-se um pequeno histórico da origem da cepa (17DD) utilizada no Brasil.



**Figura 1.7: História das passagens do lote semente YF 17DD utilizados na produção da vacina no Brasil.** O lot semente EPF374 representa a cultura na passagem 281 do vírus na passagem consecutiva em ovo. O lot semente primário P3 foi utilizado no preparo do lot semente 102/84. Este lote de YF durou para produção de vacina de 1984 até 2002, quando o lot de vacina 993FB013Z foi derivado deste segundo lote semente. A produção atual da vacina de YF utiliza este lote semente 13Z desde 2002, estando na passagem 287 (Marchevsky, 2005).

#### 1.4.2- Eventos adversos associados à vacina contra febre amarela

A vacina contra a febre amarela é o único meio eficaz de prevenir e controlar a doença, já que interrompe o ciclo de transmissão. Tem por objetivos conferir proteção individual e coletiva, bloquear a propagação geográfica da doença criando uma barreira de imunidade e prevenir epidemias. A partir de 1998, visando evitar a ocorrência de surtos de grande magnitude, o Ministério da Saúde iniciou uma ampla campanha de intensificação da



vacinação contra a febre amarela na área de risco, totalizando, até 2001, 58 milhões de doses de vacina aplicadas. Nos 1.341 municípios da área de transição, até o ano de 2002 foram aplicadas 21,4 milhões de doses de vacina numa população de 26,3 milhões de habitantes (81,2% de doses aplicadas). No país como um todo, no período de 1993 a 2003, foram aplicadas 176.626.490 de doses de vacina no Brasil. Somente em 2003, foram vacinados contra febre amarela 5.224.672 habitantes. Na área indene, a estratégia de vacinação visa assegurar que todas as pessoas que se dirijam às áreas endêmicas ou de transição sejam vacinadas com antecedência de dez dias. Com a intensificação das ações de vacinação e após a ocorrência dos primeiros eventos adversos graves associados temporalmente à vacina contra febre amarela, foi adotado um protocolo para esses eventos, tendo sido detectados cinco casos graves com quatro óbitos no período de 1999 a 2003 no país (Buss *et al.*, 2005).

A possibilidade de ocorrência de efeitos adversos está sempre presente, mesmo com emprego de vacinas consideradas seguras. A vacina contra a febre amarela é reconhecida pela tolerabilidade e segurança, sendo considerada uma das melhores contra os arbovírus (Chang 2004, Pugachev *et al.*, 2005). Daí as reações pós-vacinais, consecutivas à imunização com a cepa 17D e 17DD, serem classificadas como reações locais e sistêmicas e reações que raramente ocorrem (Galler *et al.*, 2001; Vasconcelos *et al.*, 2001; Struchiner *et al.*, 2004; Camacho *et al.*, 2005).

As reações adversas a esta vacina são geralmente leves e ocorrem, de cinco a dez dias após a vacinação. Das pessoas vacinadas 2% a 5% podem apresentar cefaléia, mal estar, dores musculares e febre baixa. Reações de hipersensibilidade imediata, caracterizada por urticária são incomuns (incidência  $<1/1.000.000$ ), e ocorrem, principalmente, em pessoas com histórico de alergia a derivados de galinha. Complicações graves, como crise convulsiva, têm sido raramente notificadas após a vacinação com a amostra 17D, ao longo de sua utilização (Chan *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2001).

Na categoria de eventos comuns de menor expressão destacam-se ainda reações de hipersensibilidade, representadas por prurido, dor, eritema e edema no local da injeção. Os indivíduos hipersensíveis à proteínas presente no ovo podem apresentar desde urticária até choque anafilático. Sintomas e sinais clínicos gerais, como hipertemia, mialgia e cefaléia ocorrendo de 3 a 8 dias após a vacinação, estão no grupo de efeitos usuais previsíveis (Vasconcelos *et al.*, 2001).

Atualmente, as encefalites pós-vacinais são raras, inesperadas e inexplicadas. A incidência de encefalite pós-vacinal na infância ( $< 6$  meses de vida) pode ser estimada entre 0,5 a 4 por 1.000. Desde 1965, nos Estados Unidos, a incidência em indivíduos acima de 9

meses foi menor do que 1 em 8 milhões. A síndrome relacionada com a encefalite 17D é caracterizada pelo início das manifestações clínicas de 7 a 21 dias após a imunização, com febre e manifestações neurológicas, tais como meningismo, convulsões e paralisia.

Em 1999, a imunização humana em campanha nacional com a vacina 17DD, produzida no Brasil (Bio-Manguinhos), acarretou a incidência de reação anafilática, hipersensibilidade, febre e convulsão febril, foi na ordem de aproximadamente 1:600.000, 1:200.000, 1:400.000 e 1:4,5 milhões, respectivamente, de um total de 13,6 milhões de doses aplicadas (FUNASA, 2006). Estes números foram muito parecidos na continuação da campanha de imunização com a aplicação de quase 18 milhões de doses até março de 2000 (Vasconcelos *et al.*, 2001).

Outro evento muito raro é a hepatite aguda em pessoas que receberam a vacina 17D contra a febre amarela. Os casos descritos no Brasil, durante as campanhas vacinais de 1938 e 1940, depois de intensa investigação, foram atribuídos a vírus adventícios, descartando-se a hipótese de viscerotropismo do vírus 17D, considerando-se que soro humano era adicionado à vacina. Em 1942, foram registrados 62 óbitos pós-vacinais, posteriormente diagnosticados como contaminação do soro humano com o vírus da hepatite B (Chan *et al.*, 2001).

Estudos retrospectivos, com eventos adversos da vacina 17D realizados no Centro para Prevenção e Controle das Doenças do termo em inglês “*Center for Disease Control and Prevetion*” (CDC), Atlanta GA no período de 1990-1998, revelaram 3 casos fatais com insuficiência hepática e renal. O seqüenciamento do genoma viral comprovou que o vírus 17D foi associado ao evento pós-vacinal (Martin *et al.*, 2001). Dois eventos pós-vacinais fatais semelhantes ocorreram no Brasil, em novembro de 1999 e fevereiro de 2000. A detecção e análise, por seqüenciamento nucleotídico do genoma de vírus isolados dos dois casos, revelou a presença do vírus vacinal 17DD em amostras de tecidos (Vasconcelos *et al.*, 2001). A síndrome associada com vacinação pelo vírus 17DD caracterizou-se pelo início, 3 a 4 dias após a imunização, com febre inespecífica seguida de rápida progressão com icterícia, insuficiência renal, hipotensão, choque e, em um dos casos, hemorragia com óbito ocorrendo 5 a 6 dias. Houve ainda elevação das aminotransferases, elevação de bilirrubina, creatina e trombocitopenia e alterações histopatológicas sugestivas de febre amarela. O vírus 17DD foi detectado por imuno-histoquímica isolado de vários órgãos (Vasconcelos *et al.*, 2001).

Até a presente data, sete casos de AVD (doença associada ao viscerotropismo) foram relatado. Quatro foram confirmados pelo isolamento e três aguardam laudo conclusivo (Martins *et al.*, 2007). Apesar da caracterização molecular e fenotípica dos vírus 17DD recuperados de cada evento adverso grave acredita-se que fatores individuais de risco

predispuseram os indivíduos vacinados ao viscerotropismo do vírus vacinal (Galler *et al.*, 2001; Vasconcelos *et al.*, 2001).

O risco de ocorrência destes eventos adversos graves associados à vacina contra a febre amarela parece estar limitado à primeira imunização com a vacina. A frequência destas reações permanece desconhecida, porém, estimativas baseadas nas estatísticas brasileiras, incluindo a vacinação infantil de rotina nas áreas de risco, indicam um risco na ordem de um caso para cada dez milhões de doses aplicadas. O risco comparativo com os dados dos Estados Unidos da América (EUA), onde predomina a vacinação de viajantes adultos, é de um caso para cada duzentos ou trezentas mil doses aplicadas e um caso para cada dez a vinte mil doses aplicadas a indivíduos com idade acima de sessenta anos de idade (WHO, 2003).

### **1.5- Desenvolvimento de vacinas virais com ênfase em vacinas inativadas**

O estado de imunidade do indivíduo pode ser induzido pelo uso de variados tipos de vacinas, as quais encontram-se, comercialmente disponíveis: microorganismos vivos atenuados; microorganismos inativados, extratos de microorganismos ou proteínas recombinantes.

As vacinas virais podem conter vírus atenuados, inativados, vacinas contendo partículas semelhantes a vírus (do termo em inglês “*Virus Like Particles*” (VLPs) ou somente subunidades protéicas. As vacinas inativadas ditas “vacinas com vírus morto”, podem apresentar problemas, como a toxicidade do agente inativante e a curta duração da resposta imunológica (Budowsky *et al.*, 1991). Por outro lado, as vacinas atenuadas, “vacinas com vírus vivo” podem gerar mutantes mais infecciosos que os vírus inoculados. A única vacina de subunidade em uso, nos dias atuais, é a vacina contra o vírus da hepatite B (Norrby, 1987). Já as vacinas contendo VLPs, são vacinas, mais recentemente, colocadas no mercado para uso humano, como exemplo, as vacinas contra rotavírus e contra o papilomavírus (Conner *et al.*, 1996; WHO, 2004; Stanley *et al.*, 2006). Outras metodologias estão sendo estudadas para serem utilizadas no desenvolvimento de vacinas comerciais como as vacinas de DNA e as vacinas utilizando vírus quiméricos. Porém, essas vacinas, em sua grande maioria, ainda estão em fase experimental.

As vacinas de DNA, como são conhecidas, utilizam o DNA na formulação da vacina, ao invés da proteína viral purificada. O processo envolve a introdução direta do DNA plasmidial, que possui o gene codificador da proteína antigênica, e será expressa no interior das células. Como possíveis desvantagens para essa metodologia podem ser citadas as

possibilidades de integração do plasmídeo ao genoma hospedeiro de maneira danosa ou a exposição do sistema imune a níveis constitutivos de antígenos durante o período de expressão do gene (Schatzmayr, 2003).

### **1.6- Metodologias para identificação do vírus da febre amarela**

O diagnóstico específico da febre amarela depende de estudos histopatológicos, isolamento do vírus, demonstração de antígenos ou ácidos nucléicos virais ou resposta específica de anticorpos. Nos primeiros cinco dias da doença, o vírus pode ser isolado do sangue, pela inoculação intracerebral de camundongos neonatos ou pela inoculação intratorácica em mosquitos *Toxorhynchites* ou ainda inoculação de culturas celulares de mosquito (Barret and Higgs, 2007). Uma linhagem celular de *A. pseudoscutellaris* apresenta alta sensibilidade para o isolamento do vírus da febre amarela e um período de três a seis dias, para a detecção do vírus, utilizando a imunofluorescência com anticorpos policlonais ou monoclonais (Barret & Higgs, 2007).

A metodologia de transcriptase reversa da reação em cadeia da polimerase do termo em inglês “*Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction*” (RT-PCR) ou a hibridização de ácidos nucléicos pode ser utilizada para o diagnóstico precoce da febre amarela nas amostras de sangue de indivíduos infectados. Os antígenos virais ou complexos IgM-antígeno no soro podem ser detectados por testes imunoenzimáticos. A sensibilidade de um ELISA do tipo captura de antígeno é de 70% e pode detectar vírus não infecciosos em amostras processadas de forma inadequada (Barret and Higgs, 2007).

Além do ELISA, outros testes sorológicos podem ser utilizados para o diagnóstico da presença do vírus ou de anticorpos da febre amarela, como por exemplo: o teste de inibição da hemaglutinação (IH), teste de fixação de complemento (FC), teste de neutralização, imunofluorescência indireta (IFI) e radioensaio. Pelos testes de IH, IFI e Neutralização pode-se detectar anticorpos uma semana após o aparecimento da doença, enquanto que por FC a detecção ocorre mais tardiamente.

### **1.7- Testes Imunológicos**

Os testes imunoenzimáticos do termo em inglês “*Enzyme immunoassay*” (EIA) ou “*Enzyme-linked immunosorbent assay*” (ELISA), como são mais conhecidos, foram desenvolvidos na década de 70. Esses testes foram realizados, simultaneamente, pelos grupos de pesquisa de Perlmann e Engvall, da Universidade de Estocolmo, e pelo grupo de Schuurs e

Bauke (Engvall & Perlmann, 1971; van Weemen & schuurs, 1974; Engvall, 1980). O teste de ELISA é utilizado tanto para detecção de antígenos como de anticorpos e apresentam com grande sensibilidade e especificidade.

O princípio do ELISA consiste de uma reação imunológica (antígeno-anticorpo) seguida de uma etapa com antígeno ou anticorpo conjugado com enzima, um substrato e uma substância reveladora. Deste modo, antígenos ou anticorpos primários são adsorvidos a uma fase sólida, usualmente uma placa de poliestireno de 96 poços. Em seguida, a superfície é lavada com uma solução tampão de bloqueio que servirá para impedir que proteínas não específicas adsorvam nessas superfícies. Posteriormente, a amostra que pode conter antígeno ou anticorpo, dependendo do método empregado. O anticorpo ou antígeno não ligado é desprezado por lavagem e à superfície é adicionado anticorpos ou antígeno ligados a uma enzima que na presença de um substrato e uma solução cromógena desenvolve cor. A intensidade da cor é proporcional à concentração do antígeno ou do anticorpo de interesse (Davis *et al.*, 1990).

O ELISA pode ser apresentado em vários modelos:

- a) O ELISA direto que funciona como um “sanduíche” montado da seguinte forma: anticorpo de captura-antígeno de interesse-anticorpo secundário conjugado com uma enzima, sendo a mais utilizada a peroxidase.
- b) O ELISA indireto, que utiliza um anti-anticorpo secundário conjugado com uma enzima.
- c) O ELISA competitivo onde o anticorpo da amostra teste compete com o anticorpo de captura frente ao antígeno específico.

Em alguns casos os resultados positivos obtidos em um ELISA podem ser confirmados por outros testes específicos como, por exemplo, o Western blot, que detecta proteínas do vírus, e o PCR, que detecta os ácidos nucléicos virais.

### **1.8- Quantificação de vírus presentes em vacinas inativadas**

O desenvolvimento das vacinas virais inativadas, provavelmente, pela necessidade de produzir vacinas virais mais seguras, uma vez que, algumas vacinas contendo vírus atenuados podem apresentar efeitos adversos decorrentes da replicação do vírus vacinal (Galler *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2001; Struchiner *et al.*, 2004). Porém, além da segurança, as vacinas inativadas precisam comprovar a sua imunogenicidade que pode ser avaliada em modelo animal na fase dos ensaios pré-clínicos e, posteriormente, em humanos. Os testes de imunogenicidade podem ser associados a ensaios de dose resposta para

determinação da “potência” da vacina. Esse método é utilizado como metodologia de quantificação “*in vivo*” da vacina inativada. Por outro lado, os ensaios mais frequentes utilizam metodologias “*in vitro*” para quantificação de antígenos virais. Normalmente, a metodologia utilizada é o teste imunoenzimático (ELISA). Alguns estudos já mostram a união dessas duas metodologias para quantificação de antígenos em vacinas inativadas (Carol *et al.*, 1989; Singer *et al.*, 1989; Rooijackers *et al.*, 1996; Maas *et al.*, 2002; Claassen *et al.*, 2003; Fuchs *et al.*, 2003; Fournier-Caruana *et al.*, 2003; Claassen *et al.*, 2004; Eugenia *et al.*, 2004).

Vacinas inativadas disponíveis, licenciadas pela OMS, fornecem exemplos de metodologias de quantificação entre estas estão: vacina inativada contra os vírus da raiva, da influenza, da hepatite A, da poliomielite e da encefalite japonesa (Carol *et al.*, 1989; Rooijackers *et al.*, 1996; Fournier-Caruana *et al.*, 2003; Fuchs *et al.*, 2003; Dragunsky *et al.*, 2004; Eugenia *et al.*, 2004). De modo geral, essas vacinas já estão consagradas, no cenário mundial, pela eficácia e segurança (Chang *et al.*, 2004).

Uma vacina inativada de uso veterinário também licenciada no mercado é a vacina contra a doença do vírus Newcastle. Muitos trabalhos são publicados visando à melhoria e adaptação de metodologias para detecção do vírus inativado nesta vacina. Vários grupos de pesquisa estão desenvolvendo métodos imunoenzimáticos utilizando anticorpos monoclonais específicos e também testes “*in vivo*” na tentativa de estabelecer uma melhor correlação entre estes testes (Rooijackers *et al.*, 1996; Maas *et al.*, 2002; Claassen *et al.*, 2003; Fuchs *et al.*, 2003; Dragunsky *et al.*, 2004). Muito desses métodos encontram-se catalogados na Farmacopéia Européia e podem ser consultados (<http://www.pheur.org/site>, outubro de 2006).

Na vacina inativada contra a raiva, utilizada na França, os Laboratórios de Controle Nacional (LCNs), preconizam testes de potência dos lotes de vacinais com ensaios “*in vivo*” e “*in vitro*” que sejam recomendados e referenciados pela Farmacopéia Européia, pelos *Official Medicines Control Laboratories* (OMCLs) e pelos requerimentos mínimos da OMS. O ELISA desenvolvido para detectar o vírus da raiva inativado é baseado na determinação da concentração da glicoproteína G do vírus da raiva (Fournier-Caruana *et al.*, 2003). Em todo produto acabado (vacinas inativadas), o Instituto Nacional de Saúde do termo em inglês “*National Institute of Health*” (NIH) faz a confirmação do teste final da potência utilizando este teste (Fournier-Caruana *et al.*, 2003).

Outros exemplos importantes são os das vacinas inativadas contra a poliomielite e contra hepatite A. Nestes casos, alguns institutos desenvolveram ELISAs específicos, onde utilizam um anticorpo monoclonal contra uma proteína específica do vírus, aumentando a sensibilidade e especificidade do teste. Além disso, fazem um estudo de imunogenicidade

com camundongos (dose-resposta), e confrontam os dois resultados, “*in vivo*” e “*in vitro*” (Singer *et al.*, 1989; Dragunsky *et al.*, 2004). Na vacina inativada contra hepatite A o conteúdo antigênico da vacina é quantificado pelo ELISA, e a potência da vacina expressa em unidades de ELISA (UE) de antígeno.

Na vacina contra a doença de Newcastle, alguns estudos mostram ainda a existência de um teste para determinação da potência da vacina, baseado na dosagem dos títulos de anticorpos da hemaglutinina-neuraminidase (inibição da hemaglutinação) e na proteção após a demonstração do desafio. A correlação entre os ensaios de potência “*in vivo*” e “*in vitro*” é confirmada com a colaboração do estudo de pré-validação feito pelos OMCLs, que determinam a quantificação dos dois antígenos. Este método de mensuração da potência da vacina deve ser proposto como um teste alternativo para o ensaio de potência da vacina comercial, podendo ser incluído como mais um método na Farmacopéia Européia (Maas *et al.*, 2002; Fuchs *et al.*, 2003; Claassen *et al.*, 2003; 2004). O Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) está desenvolvendo uma vacina inativada contra febre amarela. Neste sentido, Bio-Manguinhos precisa desenvolver e validar a sua própria metodologia de quantificação de vírus inativado. Nesta dissertação, desenvolvemos uma metodologia capaz de detectar o vírus da febre amarela, cepa 17DD, sendo esta, aplicável a detecção e a quantificação deste vírus após a sua inativação. A abordagem deste assunto representa uma estratégia necessária e inovadora, pois contribuirá com o projeto de desenvolvimento da vacina inativada contra febre amarela.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1. Objetivo Geral

Estabelecer um teste imunoenzimático (ELISA) para o vírus da febre amarela aplicável na detecção do vírus 17DD inativado que possa ser utilizado na quantificação antigênica de uma vacina.

### 2.2. Objetivos Específicos

1. Purificar e comparar os anticorpos 2D12 e M7 visando ao estabelecimento do anticorpo de captura;
2. Obter o vírus 17DD a partir da sua propagação em cultura de células Vero e Ultracentrifugação em gradiente de sacarose;
3. Identificar e selecionar os controles positivo e negativo;
4. Aplicar o ELISA na detecção do antígeno da febre amarela, sendo este o vírus 17DD inativado por formaldeído.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

---

Os experimentos foram realizados segundo Procedimentos Operacionais Padrão (POP) estabelecidos no Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV) pertencente à Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos de Bio-Manguinhos (POP n°:107020.501, 107020-302, 106030-512).

A segurança com reagentes químicos foi considerada seguindo-se as normas da Assessoria de Segurança do Trabalho e Meio Ambiente (AESTM) de Bio-Manguinhos (POP n°: 106030.301).

Todos os equipamentos e instalações utilizados foram certificados, calibrados e aprovados para o uso em laboratório, de acordo com as normas de qualidade do Laboratório de Metrologia e Validação (LAMEV) do Departamento de Garantia de Qualidade (LAMEV/DEGAQ), (POP n°:101031.549 e 102210.559).

#### 3.1. Cultivo e manutenção de células

Utilizou-se cultura de células Vero – CCL 81<sup>TM</sup> (de rim de macaco-verde africano) proveniente da Coleção Americana de Tipos Celulares do termo em inglês “*American Type Culture Collection*” (ATCC). As células foram mantidas em meio de cultura 199 com sais de Earle’s (Gibco), suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco), 2,5 % de NaHCO<sub>3</sub> a 4,4% (Merck) gaseificado, 0,1% de eritromicina (Sigma Chemical Co.), 0,1 % de Canamicina (Sigma Chemical Co.) e 0,1% de fungizona (Schering) (POP n°: 107020.501). Os meios de cultura e as soluções foram produzidos no LATEV ou no Setor de Meios e Soluções (SEMES) da Divisão de Apoio de Virais (DIAPV) do Departamento de Vacinas Virais (DEVIR) de Bio-Manguinhos, sendo preparados de acordo com o POP n°: 107020.501, seguindo-se as normas de controle de qualidade.

#### 3.2. Vírus 17DD e produção de estoques virais

Os vírus 17DD foram cultivados em sistema “roller” (garrafas do tipo rolantes de 800 cm<sup>2</sup>) em culturas de células Vero (com densidade de 62.500 células/cm<sup>2</sup>). As culturas foram inoculadas com o vírus da febre amarela, subcepa 17DD, com multiplicidade de infecção (MOI) do termo em inglês “*multiplicity of infection*” de 0,02. Posteriormente, essas culturas

permaneceram em estufa a 37° C, onde foi observado efeito citopático moderado após 7 dias. O sobrenadante das culturas foi mantido em banho de gelo até que fossem centrifugados a  $1.500 \times g$  por 20 minutos a 4 °C para clarificação, isto é, retirada de fragmentos de degradação celular e células em suspensão. As suspensões foram separadas em alíquotas de 1,3 mL e armazenadas em freezer à -70 °C, devidamente identificadas.

### **3.3. Vírus 17D, Vírus Dengue 2 e Vírus da Hepatite C**

O vírus 17D foi, originalmente, produzido no Instituto Robert Koch, onde foi cedido pela OMS. Posteriormente, esse vírus foi cedido à Bio-Manguinhos onde foi propagado em ovos embrionados e armazenados em freezer à -70 °C.

O vírus da dengue sorotipo 2 (DENV-2) foi propagado em células Vero, no LATEV, de acordo com a metodologia anteriormente descrita para o vírus da febre amarela (17DD).

O vírus da Hepatite C foi proveniente de soro de paciente do Centro de Referência Nacional para Hepatites Virais pertencente ao Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz.

### **3.4. Purificação do vírus 17DD**

O protocolo para purificação do vírus da febre amarela foi realizado de acordo com Putnak *et al.*, 1996a e Putnak *et al.*, 1996b, com algumas modificações. Partindo-se de um volume inicial de 2 L contendo sobrenadante proveniente de culturas de células Vero inoculadas com o vírus 17 DD. Após a clarificação, à suspensão viral foi adicionado PEG 8000 a 6% e 0.5 M NaCl, em agitação suave, na temperatura de 4° C, por 45 min, e após centrifugada a  $5.000 \times g$  à 4° C por 50 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o “*pellet*” foi ressuscitado com 30 mL de tampão TNE (NaCl 0,1M, EDTA 0,5 M, Tris 0,1M). O material ressuscitado foi centrifugado a  $12.000 \times g$  por 10 minutos à 4° C e o “*pellet*” foi descartado. O sobrenadante foi centrifugado a  $170.000 \times g$  por 80 min à 4° C. O sobrenadante foi descartado e o “*pellet*” ressuscitado em 3 mL com tampão TNE o que resultou em uma concentração de 10 vezes. O vírus foi purificado por um gradiente descontínuo de sacarose, em tubos de 12 mL, adicionando-se 3 frações de 30 – 60% cada uma com 2,5 mL e acrescentando-se um colchão de sacarose de 15% fração de 2,5 mL na parte superior. Posteriormente, aplicou-se 1,5 mL da amostra de vírus a ser purificada, o que resultou em um volume total de 11,5 mL por tubo. Este gradiente foi ultracentrifugado a

59.500 × g por 14:00 h à 4° C. Após a ultracentrifugação coletou-se 12 frações de 1 mL. A leitura destas frações foi realizada em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech – Ultrospec 2000) nos comprimentos de onda de 260 nm, 280 nm e 320 nm para avaliar as concentrações de proteínas. As frações que apresentaram os maiores valores de DO foram separadas. Posteriormente, foram aplicadas em gel de poliacrilamida em gradiente de 5 à 17% em condições desnaturantes para visualização do grau de pureza. As frações analisadas foram reunidas e dializadas contra tampão TNE para posterior dosagem de proteínas pelo método de Bradford (Bradford, 1976; Smith, 1985) e quantificadas por titulação em células Vero.

### **3.5. Titulação viral**

A titulação viral foi realizada pela contagem das placas de lise produzidas em monocamadas de células Vero (De Madrid & Porterfield, 1969; Allison *et al.*, 1981), sob meio 199 com sais de Earle´s completo contendo carboxil-metil-celulose a 3% (CMC) (POP n°: 107020-302). Foram utilizadas placas de 6 poços, contendo células Vero semeadas à densidade de  $10^5$  células/cm<sup>2</sup>, 24 horas antes do uso. Para a infecção, foram realizadas diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) da suspensão viral e inoculadas na monocamada com 0,1 mL de cada diluição, com incubação de 1h a 37° C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, o inóculo foi retirado e foi adicionado 3 mL de meio 199 Earle´s/CMC a 3% (CMC/Sigma Aldrich, USA) para uma incubação de 7 dias em estufa à 37° C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as placas foram fixadas com formaldeído 10% e coradas com uma solução de cristal violeta 0,4% p/v (POP n°: 106030-512). As placas de lise presentes em cada diluição foram contadas e o número de unidades formadoras de placas (PFU) por mL de amostra foi calculado. O cálculo do título viral foi realizado segundo a fórmula: n° de placas de lise x diluição correspondente x 10 (acerto do volume para 1 mL uma vez que 0,1 mL foi utilizado como inóculo) seguindo-se o cálculo do logaritmo na base 10 desse valor. Os valores foram expressos em log<sub>10</sub> PFU/mL.

### **3.6. Dosagem de proteína pelo método de Bradford**

A determinação da concentração de proteína no vírus 17DD purificado e nos anticorpos 2D12 e M7 purificados, foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando o kit da BioRad em microplacas de 96 orifícios.

### **3.7. Inativação viral**

A inativação do vírus da febre amarela foi realizada com formaldeído. Para determinação das condições de inativação foram realizadas cinéticas variando a concentração de formaldeído e do tempo de incubação necessário para inativação viral conforme descrito por Melnick, 1991, e Putnak *et al.*, 1996a.

O vírus purificado por ultracentrifugação por gradiente de sacarose foi dialisado contra tampão TNE e, posteriormente, misturado com uma solução de formol 37% (Merck PA) ajustando-se para uma concentração final de 1:4.000. Colocou-se a mistura (vírus/formol) em agitação lenta e constante à 22 °C por 48 horas. Após este tempo, neutralizou-se a reação com a adição de 1 volume de uma solução de bissulfito de sódio 35% para uma concentração final de 1:8 (Putnak *et al.*, 1996a, Putnak *et al.*, 1996b).

### **3.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

O sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) do termo em inglês “*Sodium Dodecyl Sulfate Poliacrylamide Gel Electrophoresis*” foi utilizado para analisar o grau de pureza do vírus da febre amarela. Para isso foram utilizados géis de poliacrilamida em gradiente de 5 a 17% e de 12% (Laemmli, 1970). As amostras foram previamente tratadas com tampão contendo (3-mercaptopetanol 5% (v/v), SDS 10% (v/v), tris-HCl 1,0 M pH 6,8, glicerol 8% (v/v), azul de bromofenol 0,2 g %). Posteriormente, foram aquecidas a 100°C durante 5 min. A corrida eletroforética foi realizada fixando-se a voltagem em 100 V. Após o gel foi corado em solução contendo metanol 30% e ácido acético 10%, brilhante blue G 0,4%.

### **3.9. Obtenção dos controles (positivo e negativo)**

A solução de referência de controle positivo foi elaborada a partir do antígeno 17DD obtido a partir de cultivo celular e purificado por ultracentrifugação em gradiente de sacarose conforme descrito no item 3.4, e padronizado no teste desenvolvido, na diluição 1:16 onde foi determinado a sua concentração de proteína e o título em PFU/mL. Esta solução foi aliquotada e armazenada a -70°C até o seu uso.

A solução de controle negativo foi elaborada a partir do sobrenadante da cultura celular (células Vero) não infectada, um volume de 500 mL e este sobrenadante foi purificado

conforme o sobrenadante com o antígeno 17DD, descrito no item 3.1.4, e padronizado no teste desenvolvido determinando uma diluição para uso de 1:20. Esta solução foi alíquotada e armazenada a -70°C até seu uso.

### **3.10. Obtenção e produção do fluido ascítico – anticorpo monoclonal**

O fluido ascítico (anticorpo monoclonal) utilizado neste trabalho foi produzido e fornecido pelo Laboratório de Anticorpos Monoclonais (LATAM) de Bio-Manguinhos. Este fluido contém o anticorpo monoclonal 2D12 específico para a proteína E do envelope do vírus da febre amarela cepa 17D de autoria de Schlesinger *et al.*, 1983 e Monath, 1984a,b. Originalmente, o fluido ascítico utilizado no LATAM foi proveniente da ATCC, que tem como número de catálogo: CRL-1689<sup>TM</sup>, designado 2D12, isotipo IgG2a, de cadeia leve kappa, originário de células B de camundongo (*Mus musculus* (mieloma), tipo celular linfócito B, depositado por JJ Schlesinger em 1983.

A produção de fluido ascítico foi realizada em camundongos BALBc tratados por inoculação intraperitoneal com 0,5 mL de pristane (2,6,10,14-tetramethyl-pentadecane, Sigma Aldrich), para distensão das alças intestinais. Após 10 dias, estes animais foram inoculados com  $1 \times 10^6$  células/mL do clone secretor de anticorpo, pela mesma via. A formação de fluido ascítico ocorreu em, aproximadamente, 10 dias e ele foi coletado com auxílio de uma agulha 40 x 12 mm. O sobrenadante foi obtido por centrifugação à  $300 \times g$  por 30 minutos. Posteriormente, o material foi acondicionado à - 70 °C.

### **3.11. Purificação dos anticorpos 2D12 e M7**

Para purificação do monoclonal 2D12 utilizou o sistema AFFI-Prep Protein Matrix (BioRad), padronizado a partir do protocolo original da BioRad. A dosagem protéica do referido anticorpo foi realizada utilizando-se o método de Bradford (Bradford, 1976). A resina matrix foi empacotada em coluna Poly-Prep, número de catálogo: 731-1550, com um volume de 3 mL, tendo a resina a capacidade de purificar de 8 a 10 mg/mL de proteína. Empacotou-se o volume de 3 mL respeitando esta relação de 10 mg/mL. Lavou-se a coluna com tampão de ligação (pH 9,0), com 3 vezes o volume da coluna, para equilibrar o pH. O fluido ascítico foi diluído 1:2 no tampão de ligação para um volume final de 6 mL. Em seguida, passou-se o mesmo em um filtro millipore de 0,45 µm acoplado a uma seringa de 10 mL. Posteriormente, este filtrado foi aplicado em uma coluna onde foi coletado o eluato (material não grudado na

coluna). A coluna Poly-Prep foi lavada com tampão de ligação utilizando-se um volume 15 vezes maior que o seu volume. A IgG adsorvida em resina foi eluída e coletada em alíquotas de 1 mL. Para neutralizar o pH ácido do tampão de eluição, e preservar o fluido ascítico, as frações foram incubadas com 50 µL de 1M tris-HCl (pH 11). As frações coletadas foram analisadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm. As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford e analisadas em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes para verificação do grau de pureza. A concentração final do anticorpo monoclonal 2D12 obtida pelo método de Bradford foi de 2,78 mg/mL e do anticorpo M7 de 3,68 mg/mL. Após a quantificação foi adicionada uma solução de glicerol (PBS/Glicerol v/v) e as amostras contendo 2D12 e M7 purificados foram guardadas no freezer -70 °C.

### **3.12. Conjugação do anticorpo 2D12 com a peroxidase**

O protocolo para conjugação do monoclonal 2D12 com a enzima peroxidase (HRP Sigma, 25.000 unidades, Tipo VI) foi realizado de acordo com a metodologia descrita por (Nakane e Kawaoi, 1974; Camargo *et al.*, 1987). Dissolveu-se 4 mg de peroxidase em 1 mL de água, em seguida, adicionou-se 0,2 mL de metaperiodato (0,1 M) em agitação constante, por 20 min à temperatura ambiente. Posteriormente, a solução contendo peroxidase e metaperiodato foi filtrada em coluna Sephadex G-25 (PD10) (Amersham Pharmacia Biotech), equilibrada com solução de acetato de sódio (1 mM) (pH 4,4). Após desprezar, o volume de 3,5 mL (volume de leito da coluna) coletou-se uma fração de 1,5 mL, e posteriormente, ajustou-se o pH da mistura (peroxidase/meta-periodato) para pH 9,5 utilizando-se o tampão carbonato (0,2 M) (pH 9,5).

O monoclonal 2D12 purificado contendo uma concentração de 8 mg/mL foi eluído em coluna Sephadex G25, equilibrada com tampão carbonato, (0,01 M, pH 9,5). A conjugação da peroxidase (1,5 mL) com a IgG (1,5 mL) foi realizada sob agitação constante por 2 horas. Após adicionou-se lentamente, 0,1 mL da solução de borohidrato de sódio (0,1 M), e deixou-se este conjugado por mais 2 horas à 4 ° C. Após estes procedimentos, o conjugado foi dializado em uma coluna de sephadex G-25 (PD10) equilibrada com tampão PBS tampão fosfato (Na<sub>2</sub>H PO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 0,15 mM) (pH 7,2). Novamente, 3,5 mL de volume de leito da coluna foi desprezado e 3,0 mL do conjugado coletado. O conjugado foi estocado em freezer -20 °C em uma solução de PBS/Glicerol (v/v) em uma diluição 1:10.

### 3.13. Teste imunoenzimático para detecção do antígeno da febre amarela

O teste imunoenzimático consistiu em um ELISA direto para detecção do antígeno da febre amarela subcepa 17DD. Todos os insumos utilizados no ELISA e na purificação dos anticorpos 2D12 e M7 foram produzidos no LATEV e no LATAM (Bio-Manguinhos). As soluções e os reagentes utilizados nos ELISAs foram produzidos e cedidos pelo Setor de Células e Vírus (SECVI) do Departamento de Reativos (DERED) sendo preparados de acordo com os POP n°.: 0912, 0917, 0921, 1011.

Para este ELISA desenvolvido utilizou o anticorpo monoclonal 2D12 purificado como anticorpo de captura na diluído 1:7.000 em tampão bicarbonato (1 mM, pH 9,6) (POP n°: 0912). A placa contendo anticorpo adsorvido foi incubada por 18 horas à 4°C. Após incubação, a placa foi lavada com uma solução de PBS/Tween 20 0,05 % (POP n°: 0917) por 5 vezes utilizando-se a Lavadora Skan Washer 300 (Molecular Devices). Posteriormente, foi adicionado 100 µL de tampão de bloqueio (PBS/Tween 20 0,05 %, BSA 0,05 %, SFB 3 % e leite desnatado 5% por orifício. A placa foi incubada em estufa à 37 °C por 1 hora e foi realizada uma nova seqüência de lavagens. As amostras com vírus foram adicionadas nos orifícios determinados pelo protocolo e a placa foi incubada por 1 hora a 37 °C. Lavou-se a placa por mais 5 vezes e adicionou-se 100 µL do conjugado (2D12/peroxidase) na diluição 1:2.000. Novamente, a reação foi incubada à 37 °C por 1 hora, a placa foi lavada 5 vezes e 100 µL do substrato foi adicionado, (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) junto com a solução cromógena contendo tampão fosfato-citrato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> 33mM 3,3', 5,5'tetrametilbenzidina TMB). A reação foi incubada por 10 min à temperatura ambiente protegida de luz. Por último, adicionou-se 100 µL de ácido sulfúrico 2 N (POP n°: 0921) em todos os orifícios da placa para bloquear a reação. Após observação visual, foi realizada a leitura no espectrofotômetro (BioRad modelo 680) no comprimento de onda de 450 nm. As amostras que apresentaram cor e uma DO superior ao valor de corte foram consideradas positivas. O valor de corte foi estabelecido pelo cálculo da média dos controles negativos  $\times 2,1$  referente 3 vezes o desvio padrão, em relação aos controles negativos, que é 0,7 então  $3 \times 0,7 = 2,1$ .

## 4. RESULTADOS

---

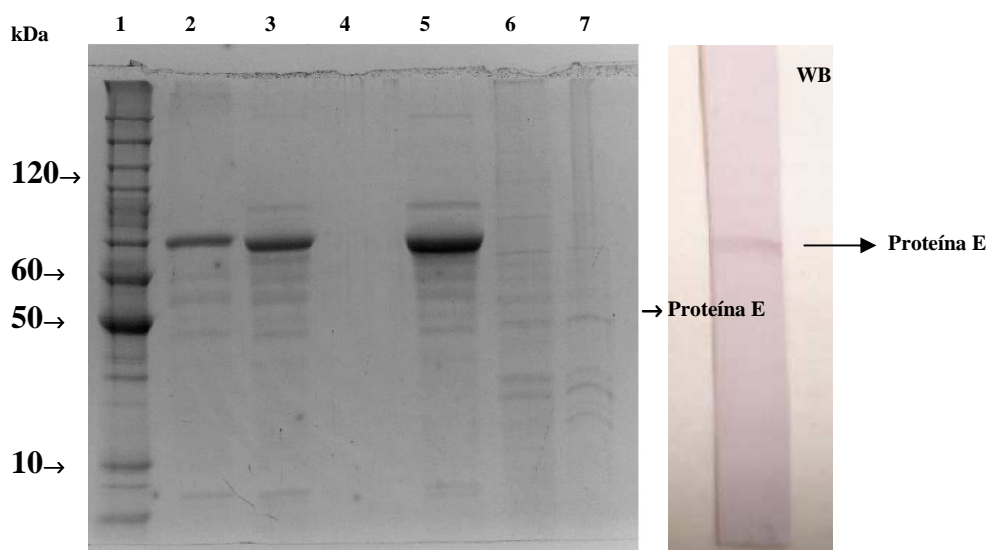
Desde 2005 Bio-Manguinhos atua em um projeto visando à produção de uma vacina contra a febre amarela utilizando vírus inativado. A partir desta proposta, o desenvolvimento de outras metodologias se torna necessário como, por exemplo, a quantificação do vírus da febre amarela inativado. Como os vírus inativados não podem infectar células, não existe a possibilidade de utilização de métodos convencionais como titulação em cultura de células e/ou determinação do efeito citopático. Assim, cada produtor de vacinas deve desenvolver um método de quantificação específico para o vírus de interesse. No presente estudo desenvolvemos um ELISA direto visando à detecção do antígeno, que, neste caso, consiste no vírus da febre amarela subcepa 17DD inativado por formaldeído.

### 4.1. Obtenção do antígeno purificado (vírus da febre amarela subcepa 17DD)

O vírus obtido a partir do meio com SFB foi utilizado como controle positivo nas reações do teste de ELISA, uma vez que o SFB não interferiu significativamente no ELISA, conforme verificado na seleção dos anticorpos para captura da fase sólida para o desenvolvimento de um ELISA para detecção do antígeno 17DD (item 4.1.5).

Na Figura 4.1 está demonstrado o resultado da purificação do vírus 17DD propagado em células Vero, onde pode-se observar a comparação deste vírus em três condições: antes de sua purificação, ou seja, somente clarificado a partir do meio com SFB diluído 1:100; após o processo de purificação, partindo-se do meio 199 com 5% de SFB; e após o processo de purificação em meio sem SFB (VP SFM AGT™ da Gibco). Tendo-se como comparação as colunas 2, 3 e 4, correspondentes respectivamente a uma solução padrão de albumina pura na concentração de 1mg/mL, ao meio 199 E'arles com 5% de SFB e ao meio sem SFB, observa-se na coluna 5 uma banda extensa de albumina existente em uma amostra do vírus a ser purificado, na coluna 6 um perfil do vírus após a sua purificação a partir do meio contendo SFB, ainda contendo uma fração de albumina contaminante, e na coluna 7 uma banda relativa à proteína de envelope na suspensão viral livre de SFB. Pode-se observar que o SFB ainda mantém contaminante de albumina na suspensão viral purificada que foi utilizada nos experimentos. Ainda assim, a utilização deste antígeno purificado foi essencial para garantir o desenvolvimento do ELISA em questão.



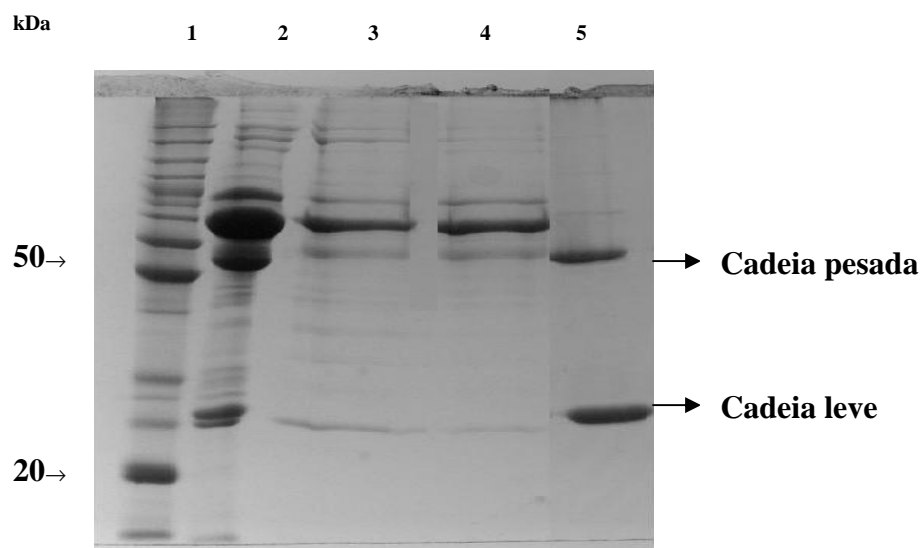


**Figura 4.1:** *Purificação do vírus da febre amarela.* Gel SDS/PAGE em gradiente de 5 a 17 % contendo as seguintes colunas: coluna 1: padrão de peso molecular (BenchMark™); coluna 2: albumina bovina (diluída 1:10); coluna 3: meio 199 Earle's contendo 5 % de SFB (diluído 1:10); coluna 4: meio VP SFM AGT™ (meio sem SFB); coluna 5: vírus 17DD clarificado (diluído 1:100); coluna 6: vírus 17DD purificado a partir do meio 199 Earle's contendo SFB; coluna 7: vírus 17DD purificado a partir do meio VP SFM AGT™. WB western blot do gel da coluna 7 confirmando a presença da proteína E.

#### 4.2. Purificação do anticorpo 2D12

O anticorpo monoclonal 2D12, obtido a partir do fluido ascítico (FA) de camundongo, foi purificado de acordo com a metodologia descrita anteriormente neste trabalho (3.1.10). Este anticorpo é específico para a proteína E do envelope do vírus da febre amarela (cepa 17D).

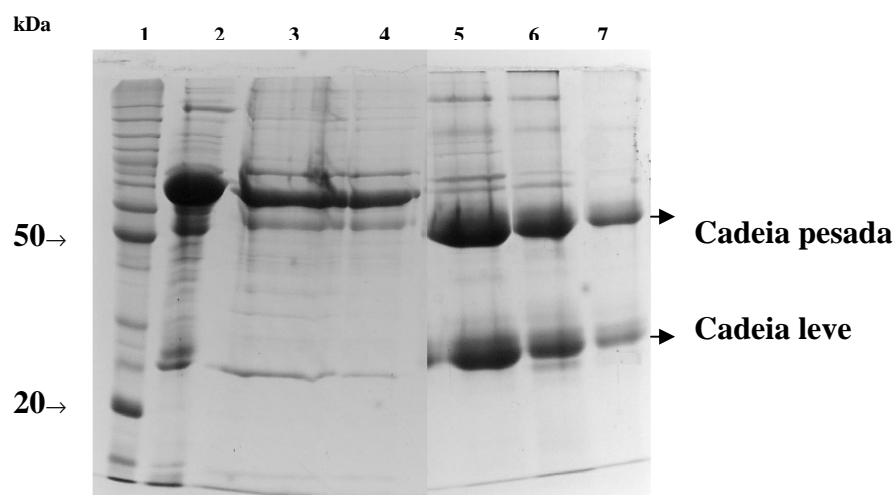
O resultado da purificação do monoclonal 2D12 está representado na Figura 4.2. A coluna 5 mostra o resultado final da purificação, onde pode ser observada a presença das proteínas referentes à cadeia leve (20 kDa) e à cadeia pesada (50 kDa) do anticorpo monoclonal 2D12. A concentração final obtida do anticorpo purificado após o processo de purificação foi de 2,78 mg/mL. O anticorpo monoclonal 2D12 purificado também foi utilizado como anticorpo conjugado com a enzima peroxidase (item 4.1.4) para aumentar a sensibilidade e especificidade do teste desenvolvido, sendo o monoclonal específico contra o vírus 17D.



**Figura 4.2:** *Purificação do anticorpo 2D12 anti-febre amarela.* Gel SDS/PAGE 12% contendo as seguintes colunas: coluna 1: padrão de peso molecular (BenchMark™); coluna 2: FA (2D12 antes da purificação, diluído 1:100); coluna 3: eluato; coluna 4: lavado (volume de leite); coluna 5: anticorpo monoclonal 2D12 (purificado).

#### 4.3. Purificação do anticorpo M7

O anticorpo policlonal M7, anti-febre amarela, proveniente de soro de macaco rhesus, foi purificado de acordo com a metodologia descrita em materiais e métodos. O resultado da purificação do anticorpo M7 está ilustrado na Figura 4.3. A coluna 7 mostra o resultado final da purificação, onde pode ser observada a presença das proteínas referentes à cadeia leve (20 kDa) e à cadeia pesada (50 kDa) do anticorpo policlonal M7. A concentração final do anticorpo M7 após o processo de purificação foi de 3,68 mg/mL. As colunas 5 e 6 mostram frações que apresentaram grau de pureza inferior ao desejado e, por esse motivo, foram reunidas e purificadas novamente. As demais colunas do gel indicam outras etapas do processo de purificação como indicado na legenda.



**Figura 4.3: Purificação do anticorpo policlonal M7.** Gel SDS/PAGE 12% contendo as seguintes colunas: coluna 1: padrão de peso molecular (BenchMark™); coluna 2: soro de macaco rhesus (M7 antes da purificação diluído 1:50); coluna 3: eluato; coluna 4: lavado (volume de leite); coluna 5: anticorpo M7 purificado (fração 1); coluna 6: anticorpo M7 purificado (fração 2); coluna 7: anticorpo M7 purificado (fração 3).

#### **4.4. Comparação de diferentes anticorpos utilizados como captura na fase sólida visando ao estabelecimento inicial de um teste de ELISA para detecção do vírus 17DD**

Vários anticorpos foram testados como captura visando ao desenvolvimento de um teste de ELISA direto para a detecção do vírus 17DD (atenuado e/ou inativado): o FA total (não purificado) proveniente da ATCC, o FA total (não purificado) proveniente do LATAM, o anticorpo monoclonal 2D12 (purificado a partir do FA da ATCC) e um soro policlonal de macaco rhesus (purificado).

Estes testes foram realizados em fase sólida, a partir de um sistema de titulação cruzadas “*checkerboard*” entre diluições do anticorpo de captura e diluições do conjugado; como conjugado foi utilizado o anticorpo purificado 2D12 / peroxidase. Os valores do sistema de diluições cruzadas foram obtidos a partir do cálculo da média dos valores de densidade ótica das amostras que continham o antígeno (valor positivo, indicado como P) dividido pela média dos valores de densidade ótica das mesmas amostras na ausência de antígeno (valor negativo, indicado como N). O cálculo da razão P/N mostra de forma mais pronunciada a diferença numérica entre os valores da densidade ótica de P e da densidade ótica de N.

Na Tabela 4.1 está demonstrado o resultado da titulação cruzada do anticorpo 2D12 não purificado proveniente do fluido ascítico obtido da ATCC utilizado como captura frente

às diluições do conjugado (2D12/peroxidase). A diluição ideal estabelecida pela razão P/N para estes insumos foi de 1:7000 para o captura e 1:1000 para o conjugado.

**Tabela 4.1: Titulação cruzada para determinação da diluição ideal do anticorpo de captura 2D12 não purificado frente ao conjugado (2D12/peroxidase)**

Conjugado 2D12/peroxidase	CAPTURA - Diluição do anticorpo 2D12, não purificado, (ATCC) (valores de P/N*) (x±dp)**						
	1:2.000	1:3.000	1:4.000	1:5.000	1:6.000	1:7.000	1:8.000
1:1.000	2,87±0,01	1,36±0,22	2,49±0,26	2,23±0,09	3,48±0,03	6,79±0,08	5,87±0,02
1:2.000	2,59±0,01	3,08±0,09	3,52±0,06	2,75±0,01	4,52±0,04	4,54±0,02	5,54±0,01
1:3.000	1,33±0,03	1,21±0,02	1,39±0,04	0,81±0,01	2,96±0,01	3,96±0,01	2,50±0,01
1:4.000	1,10±0,03	0,55±0,01	0,57±0,05	3,28±0,01	3,03±0,01	2,66±0,01	3,48±0,01

\*P/N = média dos valores de densidade ótica das amostras que continham o antígeno dividido pela média dos valores de densidade ótica das mesmas amostras na ausência de antígeno.

\*\* $(x \pm dp)$  = média  $\pm$  desvio padrão.

O maior valor de P/N foi colocado em destaque na cor amarela para facilitar a visualização do resultado.

Na Tabela 4.2 está demonstrado o resultado da titulação cruzada do anticorpo 2D12 não purificado proveniente do fluído ascítico obtido do LATAM usado como captura frente às diluições do conjugado (2D12/peroxidase), onde a diluição ideal estabelecida para estes reagentes foi de 1:6000 para o captura e 1:1000 para o conjugado.

**Tabela 4.2: Titulação cruzada para determinação da diluição ideal do anticorpo de captura 2D12 não purificado frente ao conjugado (2D12/peroxidase)**

Conjugado 2D12/peroxidase	CAPTURA - Diluição do anticorpo 2D12, não purificado, (LATAM) (valores de P/N*) (x±dp)**						
	Diluição do conjugado	1:2.000	1:3.000	1:4.000	1:5.000	1:6.000	1:7.000
1:1.000	3,28±0,04	3,06±0,02	2,95±0,07	1,99±0,10	3,57±0,02	3,40±0,06	3,74±0,04
1:2.000	3,13±0,17	3,37±0,01	3,36±0,01	2,15±0,02	3,09±0,01	3,42±0,01	4,32±0,02
1:3.000	2,44±0,01	2,67±0,01	3,02±0,01	2,95±0,04	2,93±0,01	3,08±0,01	3,45±0,01
1:4.000	2,38±0,01	2,34±0,02	1,84±0,07	2,26±0,01	3,75±0,01	2,58±0,01	2,90±0,01

\*P/N = média dos valores de densidade ótica das amostras que continham o antígeno dividido pela média dos valores de densidade ótica das mesmas amostras na ausência de antígeno.

\*\* $(x \pm dp)$  = média  $\pm$  desvio padrão.

O maior valor de P/N foi colocado em destaque na cor amarela para facilitar a visualização do resultado.

Na Tabela 4.3 está demonstrado o resultado da titulação cruzada do anticorpo de captura 2D12 purificado (concentração inicial de (2,5 mg/mL) frente às diluições do conjugado (2D12/peroxidase), onde a diluição ideal estabelecida para estes insumos foi de 1:7000 para o captura e 1:2000 para o conjugado.

**Tabela 4.3: Titulação cruzada para determinação da diluição ideal do anticorpo de captura 2D12 purificado frente ao conjugado (2D12/peroxidase)**

Conjugado 2D12/peroxidase	CAPTURA - Diluição do anticorpo monoclonal 2D12 (purificado). (valores de P/N*) (x±dp)**						
	Diluição do conjugado	1:2.000	1:3.000	1:4.000	1:5.000	1:6.000	1:7.000
1:2.000	4,87±0,03	12,86±0,03	5,95±0,01	5,50±0,01	12,79±0,05	14,95±0,02	7,14±0,05
1:3.000	8,33±0,12	12,01±0,01	7,38±0,03	8,65±0,07	11,57±0,05	16,20±0,01	11,10±0,09
1:4.000	8,94±0,04	9,66±0,01	6,63±0,04	8,22±0,02	10,44±0,10	13,85±0,02	10,11±0,06
1:5.000	6,33±0,01	4,86±0,02	4,79±0,10	5,70±0,03	11,62±0,06	8,11±0,03	5,2±0,02

\*P/N = média dos valores de densidade ótica das amostras que continham o antígeno dividido pela média dos valores de densidade ótica das mesmas amostras na ausência de antígeno média da DO.

\*\* $(x \pm dp)$  = média  $\pm$  desvio padrão.

O maior valor de P/N foi colocado em destaque na cor amarela para facilitar a visualização do resultado.

O maior valor de P/N foi colocado em destaque na cor amarela para facilitar a visualização do resultado. O valor de P/N destacado em azul é referente à diluição ideal do conjugado definida como a mais apropriada para ser utilizada na padronização e otimização dos ensaios conforme descrito no (Item 4.1.6).

O resultado da titulação cruzada do anticorpo policlonal M7 anti-febre amarela na (concentração inicial 2,5 mg/mL) com o conjugado (2D12/peroxidase) (Tabela 4.4) mostrou que o anticorpo policlonal M7 não foi muito eficaz, apresentando um valor de P/N menor do que os valores obtidos para o anticorpo 2D12, como pode ser observado nas Tabelas 4.4 e 4.5.

**Tabela 4.4: Titulação cruzada para determinação da diluição ideal do anticorpo de captura M7 purificado frente ao conjugado (2D12/peroxidase)**

	CAPTURA Diluição do anticorpo M7 purificado (purificado) utilizado como captura (valores de P/N) ( $\bar{x} \pm dp$ )						
Diluição do conjugado	1:2.000	1:3.000	1:4.000	1:5.000	1:6.000	1:7.000	1:8.000
1:2.000	6,21±0,01	4,75±0,01	3,76±0,03	1,90±0,03	2,68±0,01	4,40±0,02	3,21±0,01
1:3.000	5,75±0,01	5,90±0,03	4,42±0,07	3,15±0,02	2,93±0,01	3,92±0,03	2,79±0,03
1:4.000	6,16±0,03	4,78±0,02	3,66±0,01	2,72±0,04	3,43±0,03	3,70±0,01	3,03±0,04
1:5.000	4,46±0,02	2,70±0,01	2,03±0,01	1,74±0,02	2,39±0,02	1,61±0,08	1,23±0,01

\*P/N = média dos valores de densidade ótica das amostras que continham o antígeno dividido pela média dos valores de densidade ótica das mesmas amostras na ausência de antígeno.

\*\*( $\bar{x} \pm dp$ ) = média  $\pm$  desvio padrão.

O maior valor de P/N foi colocado em destaque na cor amarela para facilitar a visualização do resultado.

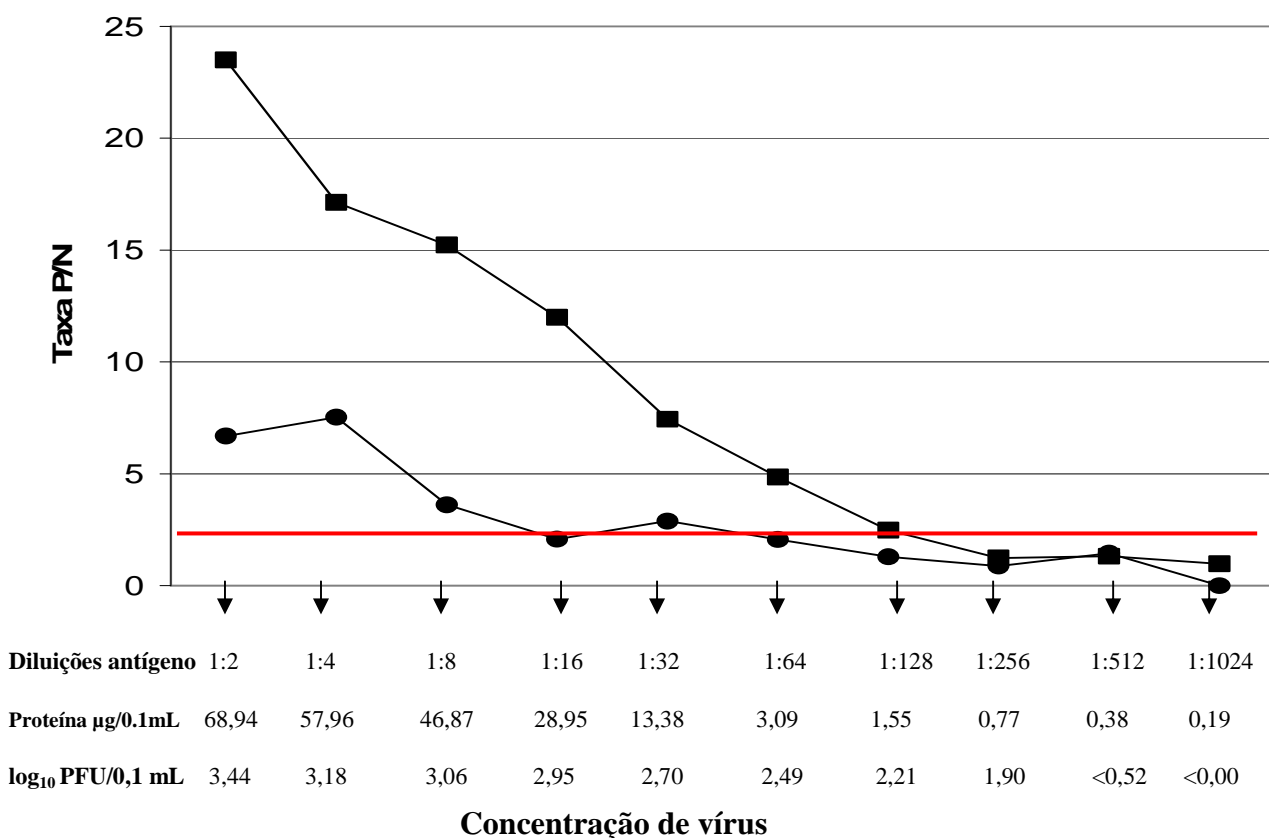
#### 4.5. Seleção dos anticorpos de captura para o desenvolvimento de um ELISA para detecção do antígeno 17DD

Foi realizado um “*checkerboard*” para cada condição estabelecida, com o objetivo de obter as condições ótimas de reação para cada anticorpo testado. As condições analisadas foram agrupadas em uma tabela para facilitar a comparação dos resultados (Tabela 4.5). O anticorpo 2D12 é mostrado em destaque na cor cinza por conter as condições mais favoráveis para utilização no ELISA em questão.

**Tabela 4.5: Determinação da titulação cruzada dos anticorpos 2D12 e M7 frente ao conjugado 2D12/peroxidase**

Especificação	Origem	Preparação	Diluição do captura	Diluição do conjugado
<b>2D12</b>	<b>camundongo</b>	<b>Purificado</b>	<b>1:7.000</b>	<b>1:2.000</b>
M7	Primata	Purificado	1:2.000	1:2.000
FAC (ATCC)	camundongo	Fluído Ascítico	1:7.000	1:1.000
FAC (LATAM)	camundongo	Fluído Ascítico	1:6.000	1:1.000

Com a finalidade de comparar a sensibilidade dos anticorpos 2D12 e M7, foi realizado um teste onde foram obtidos os valores de P/N em função da quantidade de proteínas totais e do título viral expresso em  $\log_{10}$  PFU/mL (Figura 4.4).



**Figura 4.4: Comparação entre o anticorpo monoclonal 2D12 (■) e o anticorpo policlonal M7 (●) quando foram utilizados como captura.** Os anticorpos 2D12 e M7 foram analisados a partir da comparação dos valores de P/N em diferentes diluições do antígeno utilizado (vírus 17DD purificado). A dosagem de proteínas foi obtida pelo método de Bradford e o valor do título viral foi obtido pelo método de  $\log_{10}$  PFU/mL. O valor de corte utilizado foi igual a 2 e está representado na forma de linha vermelha.

Como pode ser visualizado na Figura 4.4, o anticorpo de captura 2D12 apresentou sensibilidade superior ao anticorpo de captura M7. Os valores de P/N apresentados pelo anticorpo M7 foram inferiores aos do 2D12, exceto na diluição 1:64, onde o título viral não foi mais detectado. Por outro lado, o anticorpo 2D12 mostrou-se capaz de detectar o vírus 17DD até a diluição 1:128, onde o vírus ainda apresentava um título viral de 2,21 log<sub>10</sub> PFU/0,1mL. Outra observação de que o anticorpo M7 não apresentou as melhores condições para ser utilizado no ELISA foi o fato de apresentar valores de DO do controle negativo muito alto, o que resultava na presença de uma cor de fundo significativa nas placas analisadas. O valor de corte, neste caso, foi considerado como sendo o valor de P/N igual a 2. Este valor foi escolhido por retratar o fato do denominador da razão P/N ser numericamente metade do valor do numerador. Além disso, este valor pode ser utilizado para comparar a eficiência de reações utilizando anticorpos diferentes.

#### 4.6. Estabelecimento dos controles positivo e negativo

Durante o desenvolvimento, inicial, do teste de ELISA para febre amarela, o antígeno 17DD purificado, foi utilizado como controle positivo (na diluição 1:4) e o meio 199 Earle's (fruto de um processo de purificação semelhante ao utilizado para o vírus 17DD) foi utilizado como controle negativo. Com o objetivo de determinar a diluição ideal para cada um desses controles foram realizados os testes descritos na Tabela 4.6. Os resultados mostraram que a diluição para o controle positivo foi estabelecida na diluição 1:16 e a diluição 1:20 foi definida como condição ideal de uso para o controle negativo.

**Tabela 4.6:** *Determinação da diluição ideal de uso para os controles positivo e negativo.*

<b>Controle positivo</b> Diluições/ vírus 17DD	<b>Média dos valores de DO do controle positivo</b> ( $x \pm dp$ )	<b>Controle negativo</b> Diluições/meio 199 Earle's purificado	<b>Média dos valores de DO do controle negativo</b> ( $x \pm dp$ )
<b>1:16</b>	1,259±0,18	Sem diluir	0,053±0,01
<b>1:32</b>	0,526±0,02	1:10	0,050±0,01
<b>1:64</b>	0,307±0,01	<b>1:20</b>	<b>0,048±0,01</b>
<b>1:128</b>	0,181±0,01	1:40	0,073±0,01

A diluição do controle positivo escolhida para uso está ressaltada na cor amarela. A diluição do controle negativo está identificada em azul. O valor de corte deste ensaio foi de 0,149. Neste ensaio os controles foram testados em triplicata.



Para validação dos valores de corte dos controles positivo e negativo foi realizada uma análise estatística da média dos valores de DO de 50 testes de ELISA. A média dessa amostragem foi de  $0,108 \pm 0,034$  com um intervalo de confiança de 95%.

#### 4.7.Otimização das condições pré-estabelecidas: estabelecimento do uso do conjugado na diluição 1:2.000

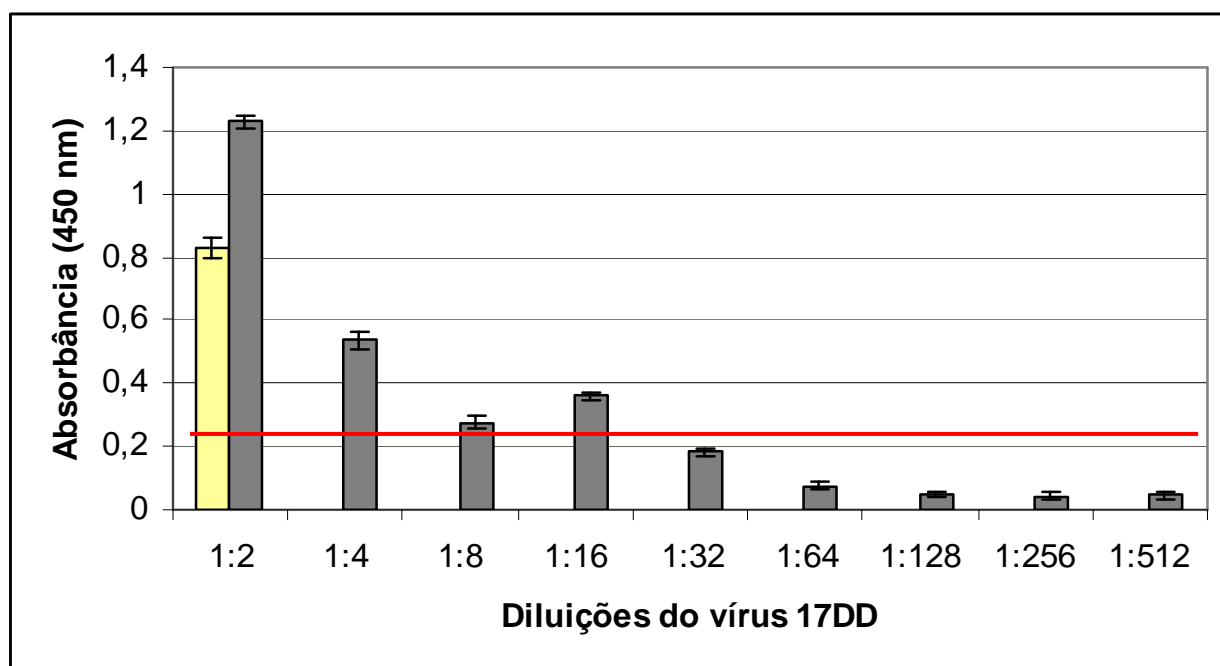
A comparação dos resultados do ELISA utilizando conjugado nas diluições 1:2.000 e 1:3.000 mostrou que a diluição 1:2.000 apresentou melhores condições para uso. Isto porque apresentou um valor de DO mais alto e, em paralelo, valores de controle negativo e positivo com menos cor de fundo. O resultado está demonstrado na Tabela 4.7.

**Tabela 4.7:** Comparação de dois testes diferentes utilizando conjugado na diluição 1:2.000 (A) e 1:3.000 (B). Os valores de corte foram 0,144; (A) e 0,149; (B). Nos dois ensaios, tanto os controles como as diluições do vírus 17DD foram testadas em triplicata.

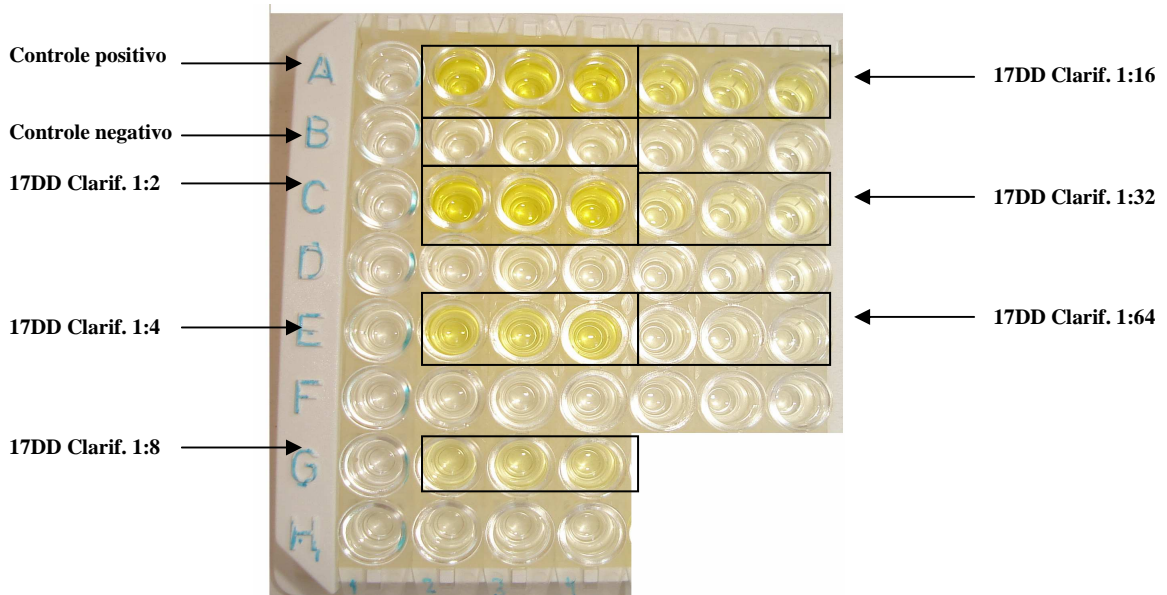
<b>A</b> Conjugado na diluição 1:2000		<b>B</b> Conjugado na diluição 1:3000	
Diluições do vírus 17DD (purificado)	Média das DO do vírus 17DD (purificado) (x±dp)	Diluições do vírus 17DD (purificado)	Média das DO do vírus 17DD (purificado) (x±dp)
<b>1:16</b>	1,080±0,05	<b>1:16</b>	0,788±0,01
<b>1:32</b>	0,683±0,07	<b>1:32</b>	0,368±0,01
<b>1:64</b>	0,430±0,03	<b>1:64</b>	0,207±0,01
<b>1:128</b>	0,249±0,01	<b>1:128</b>	0,123±0,01
<b>Controle positivo (1:16)</b>	Valor de DO (x±dp) 0,790±0,01	<b>Controle positivo (1:16)</b>	Valor de DO (x±dp) 0,780±0,01
<b>Controle negativo (1:20)</b>	Valor de DO (x±dp) 0,068±0,01	<b>Controle negativo (1:20)</b>	Valor de DO (x±dp) 0,071±0,01

#### 4.8. Análise da especificidade do teste de ELISA para o vírus 17DD atenuado

Para confirmação da possibilidade de reprodução do teste desenvolvido para o vírus 17DD atenuado, utilizamos as condições estabelecidas na Tabela 4.7, item A (controle positivo; diluição 1:16, Título viral  $2,95 \log_{10}$  PFU/0,1mL e concentração de proteína  $29 \mu\text{g}/0,1\text{mL}$ ), controle negativo; diluição 1:16, conjugado diluição; 1:2.000). O título inicial do vírus da febre amarela utilizado como teste neste ensaio foi de  $7,2 \log_{10}$  PFU/mL. Os resultados estão mostrados abaixo nas Figuras 4.5 e 4.6.

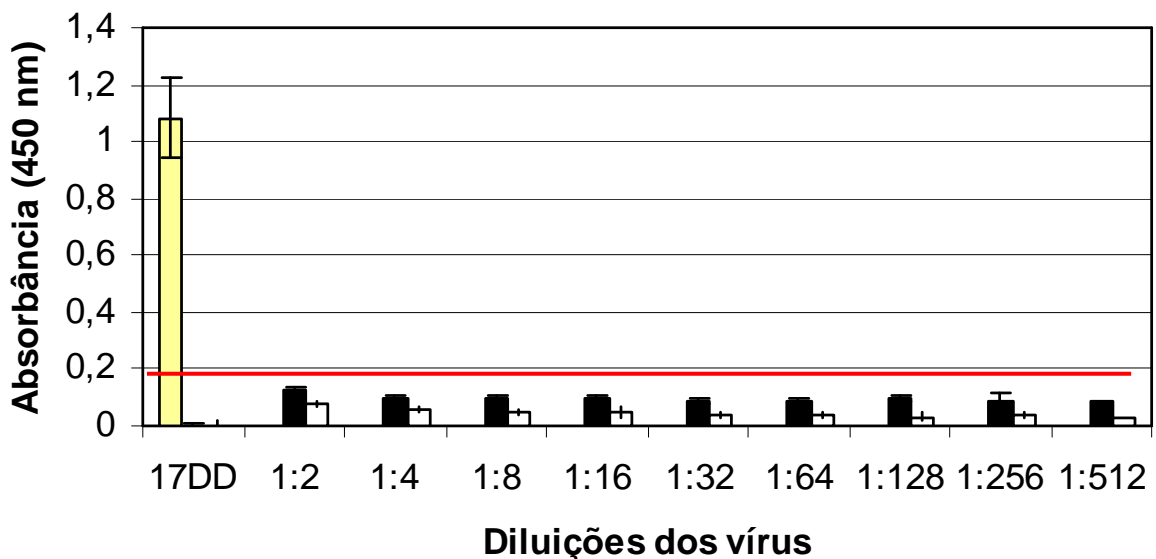


**Figura 4.5:** Análise da detecção do vírus 17DD (atenuado/clarificado) pelo teste de ELISA. (■) Controle positivo 1/16; (■) vírus 17DD. A diluição do conjugado utilizada foi de 1:2.000. Neste ensaio, tanto os controles como as diluições do vírus 17DD foram testadas em triplicata. O valor de corte foi de 0,212 e está representado na forma de linha vermelha.



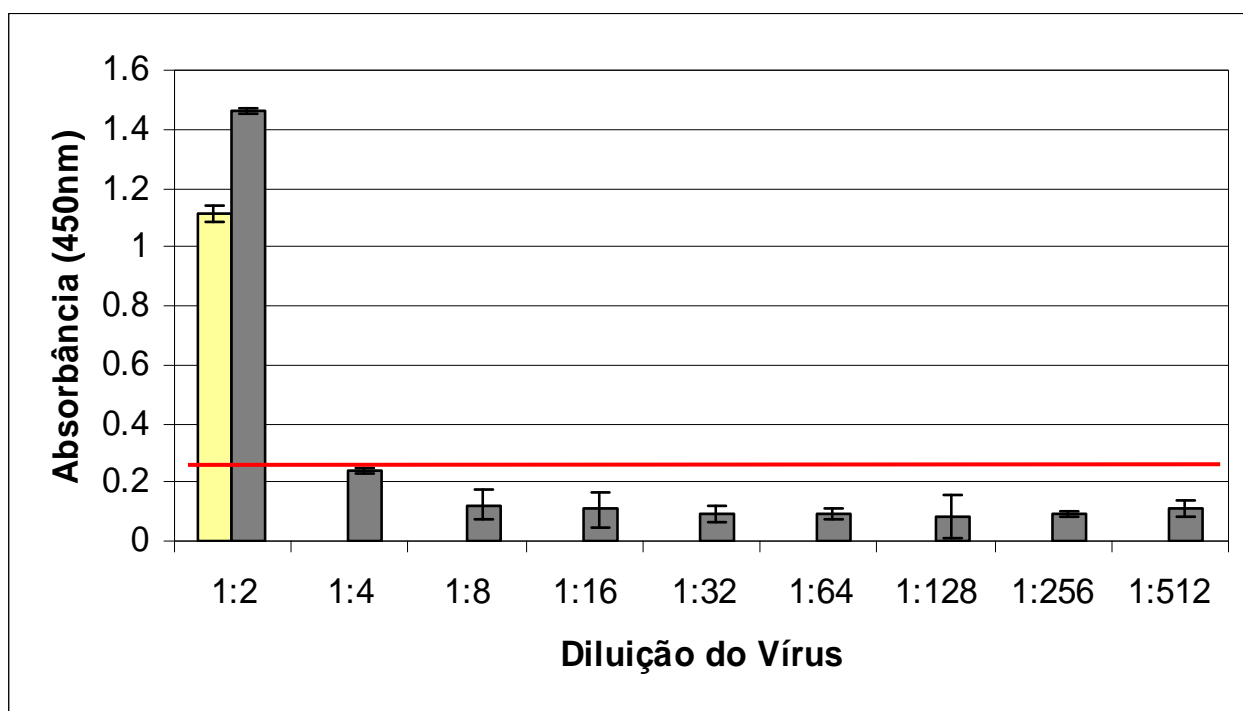
**Figura 4.6:** Visualização do teste para detecção do vírus 17DD (atenuado/clarificado) pelo teste de ELISA. Todas as amostras estão em triplicata.

Para avaliação do grau de especificidade do ensaio desenvolvido, as condições pré-estabelecidas para detecção do vírus 17DD também foram aplicadas na detecção de outros vírus da mesma família do vírus da febre amarela: vírus da dengue tipo 2 e o vírus da hepatite C. Os resultados obtidos neste ensaio estão mostrados na Figura 4.7. O título inicial do vírus dengue utilizado neste como teste neste ensaio foi de  $7,6 \log_{10}$  PFU/mL.



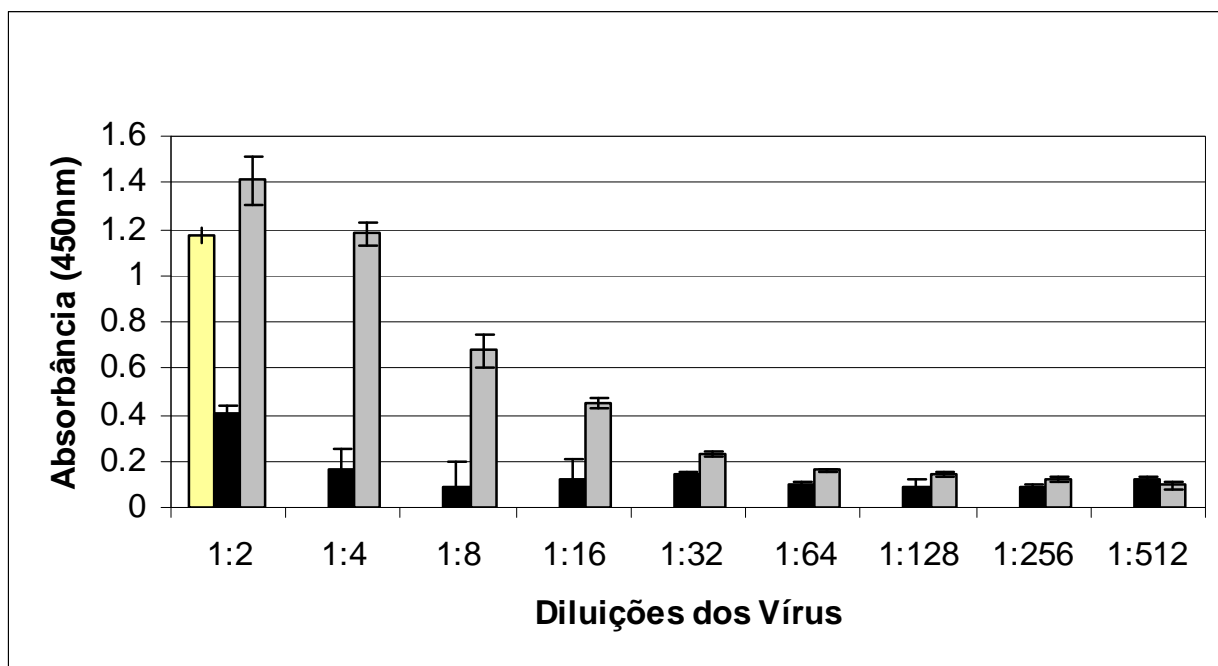
**Figura 4.7:** Análise da especificidade do teste de ELISA para os vírus da dengue 2 e da hepatite C. (■) controle positivo 1/16; (■) dengue 2; (□) hepatite C. O valor de corte deste ensaio foi de 0,198 e está representado na forma de linha vermelha. Neste ensaio, tanto os controles como as diluições dos vírus dengue tipo 2 e hepatite C foram testados em triplicata.

Para a determinação da especificidade do ELISA desenvolvido para detecção do vírus 17D (produzido a partir de células embrionárias de ovo de galinha) as condições descritas na Tabela 4.7A foram utilizadas (Figura 4.8). Os resultados mostraram que a detecção do vírus 17D ocorreu somente na diluição 1:2, pois somente nesta diluição foi possível visualizar cor no ensaio.



**Figura 4.8:** *Análise da especificidade do teste de ELISA para o vírus 17D.* (■) controle positivo 1/16; (■) vírus 17D. O valor de corte para o ensaio foi de 0,225 e está representado na forma de linha vermelha. Neste ensaio, tanto os controles como as diluições do vírus 17D foram testados em triplicata.

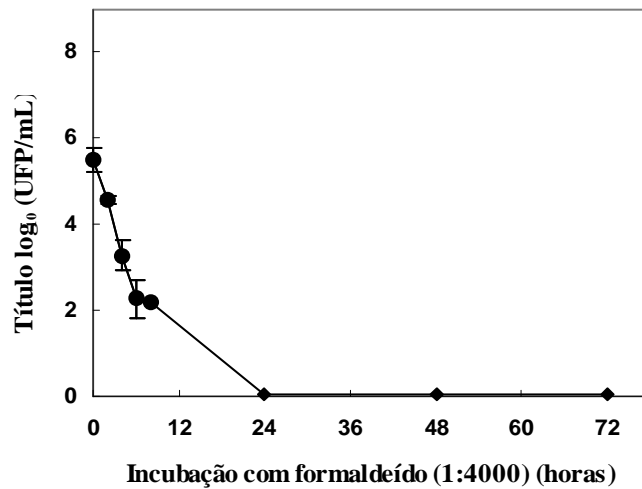
Para avaliação do grau de sensibilidade em relação a amostras do vírus 17DD propagado em células de ovo embrionado ou cultura de células Vero, novamente, utilizou-se as condições pré-definidas na Tabela 4.7A. Os resultados mostraram que o ensaio funcionou melhor para os vírus produzidos em cultura de células, como demonstrado na Figura 4.9.



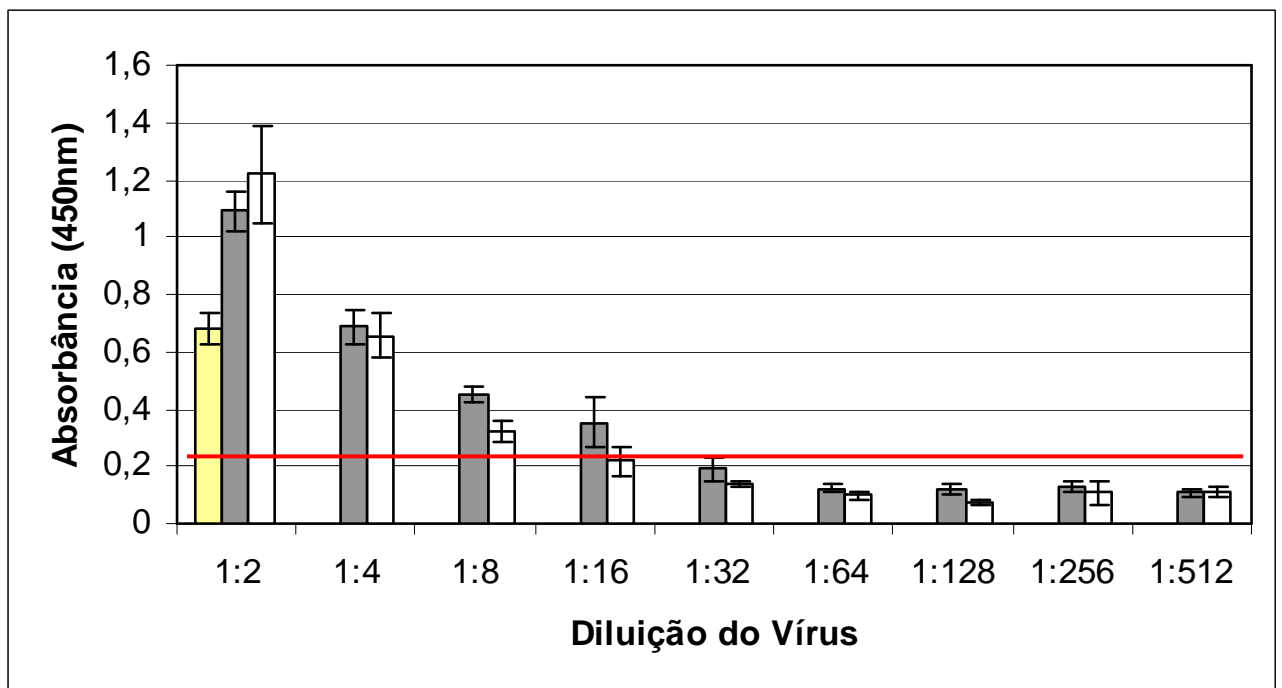
**Figura 4.9:** Análise do ELISA para o vírus 17DD cultivado em ovo embrionado ou em cultura de células Vero. (■) Controle Positivo 1/16; (■) vírus 17DD vacinal; (■) vírus 17DD produzido em cultura de células Vero. O valor de corte foi de 0,182 e está representado na forma de linha vermelha. Neste ensaio, tanto os controles como as diluições do vírus 17DD foram testados em triplicata.

#### 4.9. Aplicação do teste de ELISA para detecção do vírus 17DD inativado por formaldeído

Com a finalidade de avaliar a aplicação do ELISA desenvolvido na detecção de amostras inativadas foi utilizada uma abordagem química: a inativação por formaldeído. A inativação por formaldeído foi definida na cinética que está demonstrada na Figura 4.10. A amostra de vírus antes de ser inativada por formaldeído apresentava um título viral de 3,95 log<sub>10</sub> PFU/mL e após a inativação este título não foi mais confirmado pela titulação do vírus em células Vero pelo método de log<sub>10</sub> PFU/mL, dando resultado negativo nas três diluições testadas: 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>. O ELISA desenvolvido demonstrou um resultado satisfatório na detecção da amostra inativada por formaldeído, com resultado positivo até a diluição 1:16, como demonstrado na Figura 4.11.



**Figura 4.10:** *Cinética de redução da infecciosidade do vírus 17DD por formaldeído.* O vírus 17DD foi incubado com formaldeído na concentração 1:4.000, nos períodos de (0 à 72 horas) a temperatura de 4°C. Os valores de título viral foram obtidos pelo método de log<sub>10</sub> PFU/mL.



**Figura 4.11:** *Deteção do vírus 17DD inativado por formaldeído produzido em célula Vero com meio 199 Earle's com soro fetal bovino e em meio VP SFM AGT<sup>TM</sup> sem soro pelo ELISA.* (■) Controle positivo 1/16; (■) vírus 17DD produzido em meio com soro; (□) vírus 17DD produzido em meio sem soro. O vírus 17DD foi obtido a partir da propagação em cultura de células Vero. O título viral das amostras inativadas foi confirmado pela titulação do vírus em células Vero pelo método de log<sub>10</sub>PFU/mL. O valor de corte para o ensaio foi de 0,214 e está representado na forma de linha vermelha. Neste ensaio, tanto os controles como as diluições do vírus 17DD foram testadas em triplicata.

## 5. DISCUSSÃO

---

### 5.1. Aspectos gerais necessários ao desenvolvimento de um teste de ELISA

Os principais métodos de quantificação viral utilizados em vacinas comerciais inativadas estão descritos nas farmacopéias Européia e Americana e nos requerimentos mínimos estipulados pela OMS, e são geralmente testes imunoenzimáticos (ELISA). O ELISA desenvolvido neste trabalho apresenta quatro etapas: adsorção de um anticorpo primária, específica para o vírus da febre amarela, na fase sólida; amostra-teste contendo vírus; anticorpo secundário conjugado com peroxidase; e substrato da peroxidase.

Em 1984, Monath e Nystrom descreveram um ELISA para detecção do vírus 17D em amostras de soro de macaco e em soro de humanos infectados pelo vírus da febre amarela (Monath & Nystrom, 1984a), e comparando a utilização de vários anticorpos como captura. Os resultados mostraram que o anticorpo monoclonal 5E3 proporcionava uma sensibilidade superior aos demais no teste para detecção do vírus 17D. A sensibilidade do teste foi medida pela capacidade de detecção do título viral, que foi de  $2,21 \log_{10}$  PFU/0,1mL e da quantidade de proteínas ( $1,55 \mu$ /0,1mL). Posteriormente, outros trabalhos que utilizaram imunofluorescência para detecção do vírus 17D mostraram que, de um modo geral, que anticorpos monoclonais são mais eficientes do que anticorpos policlonais quando são utilizados como captura. O anticorpo monoclonal 2D12 foi um dos anticorpos, utilizados que proporcionou maior sensibilidade aos testes desenvolvidos (Monath *et al.*, 1984a,b).

Em 1986, foi descrito um teste de radioimunoensaio (RIA), por Monath e colaboradores, também para detecção do vírus 17D (Monath *et al.*, 1986), que também mostrou um aumento da sensibilidade para detecção do vírus 17D. Os melhores resultados obtidos utilizaram os anticorpos monoclonais 5H3 ou 2D12 como captura e o anticorpo 2E10, também um monoclonal, como anticorpo secundário. Nesse teste, a sensibilidade de detecção foi de 1,3 para  $2,0 \log_{10}$  (100-1000 vezes mais sensível do que o ensaio desenvolvido por Monath & Nystrom em 1984). Esses resultados reforçam a importância do aperfeiçoamento contínuo de testes para detecção do antígeno da febre amarela e da necessidade de comparação da sensibilidade e da especificidade dos testes utilizando diferentes anticorpos monoclonais e/ou policlonais como anticorpos primários e/ou anticorpos secundários marcados (conjugados a uma enzima (ELISA) ou marcados radioativamente (RIA)).

A primeira etapa, desta pesquisa de desenvolvimento do ELISA para o vírus foi a

produção, a purificação e a caracterização dos elementos que poderiam compor o teste: o antígeno de interesse (o vírus 17DD), o anticorpo monoclonal 2D12, o anticorpo policlonal M7 e o conjugado (2D12/peroxidase).

## **5.2. Padronização de um teste de ELISA para detecção do vírus da febre amarela: obtenção do vírus 17DD**

A purificação do vírus 17DD foi realizada conforme metodologia previamente descrita (Putnak *et al.*, 1996a, Putnak *et al.*, 1996b). Neste procedimento, é esperado que o vírus apresente aproximadamente 70% de grau de pureza (Putnak *et al.*, 1996a). O rendimento desta técnica é considerado muito baixo e insuficiente para ser aplicado em uma área de produção de vacinas mas, por outro lado, se mostrou suficiente para a produção de amostras purificadas para servir como controle positivo no ELISA proposto. A otimização de um processo de purificação visando um aumento do rendimento e o grau de pureza consiste em um grande desafio, não só para o vírus da febre amarela, como, também para outros vírus que apresentam envelope viral (Putnak *et al.*, 1996a, Appaiahgari & Vрати, 2004; Putnak *et al.*, 2005). Neste trabalho, verificou-se que o principal elemento contaminante após a purificação do vírus 17DD foi a albumina bovina presente no SBF parte integrante do meio de cultura (Figura 4.1).

Uma alternativa para impedir a contaminação de albumina bovina das preparações virais seria a utilização de meio de cultura sem soro fetal (Mertem *et al.*, 1999; Butler *et al.*, 2000; Sugawara *et al.*, 2002; Frazatti-Gallina *et al.*, 2004). Observamos neste trabalho que o grau de pureza do vírus 17DD foi melhorado quando utilizado um meio de cultura sem soro fetal (meio VP SFM AGT<sup>TM</sup>) (Figura 4.1).

O vírus 17DD utilizado para padronização do teste de ELISA e estabelecimento do controle positivo foi purificado a partir de meio de cultura contendo soro fetal (meio 199 Earle's) e o vírus purificado a partir de meio de cultura sem soro fetal foi apenas utilizado no último teste experimental, com o vírus da febre 17DD inativado por formaldeído. Verificou-se que a albumina não interferiu na quantificação viral pelo ELISA quando foram testadas amostras do vírus 17DD produzidas com meio utilizando soro fetal bovino e amostras com vírus 17DD produzidas em meio sem soro (Figura 4.11). Este fato serviu para demonstrar que o ELISA desenvolvido foi capaz de detectar vírus na presença ou na ausência de albumina residual (Figura 4.9). Nossos resultados mostraram também, que o teste desenvolvido ainda não foi capaz de detectar o vírus 17DD produzido em ovo embrionado (vacina comercial



produzida por Bio-Manguinhos). Uma possível explicação para este fato pode estar relacionada à presença de muitas proteínas na preparação em ovo embrionado, que provavelmente, podem estar interferindo no teste, ligando-se ao vírus e impedindo a sua interação com o anticorpo monoclonal 2D12. Apesar do título da amostra testada (vacina de Bio-Manguinhos) ter sido de  $4,72 \log_{10}$  PFU/0,1mL, o resultado positivo foi detectado somente na diluição 1:2. Este fato também ocorreu para o vírus 17D (obtido em preparações semelhantes à vacina de Bio-Manguinhos contendo o vírus 17DD) (Figura 4.8).

### **5.3. Aspectos gerais relacionados ao desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos**

Vários trabalhos discutem sobre os requisitos necessários para aumentar a sensibilidade e a especificidade de um ELISA (Monath, *et al.*, 1986; Davis *et al.*, 1990; Goers, 1993; Lequin, 2005; Karaszkiwicz *et al.*, 2006). A especificidade de ligação de um anticorpo é determinada pelos resíduos de aminoácidos variáveis das suas cadeias pesadas e leves. Alguns, particularmente aqueles que revestem o sítio de ligação antígeno-anticorpo, são hipervariáveis. A especificidade é conferida pela complementariedade química entre o antígeno e o seu sítio de ligação específico, em termos de forma e localização de grupos carregados não-polares e de pontes de hidrogênio (Davis *et al.*, 1990). A afinidade e a especificidade da ligação dos anticorpos os tornam reagentes analíticos valiosos. A afinidade dos anticorpos, por outro lado, está relacionada ao tipo de anticorpo: anticorpos monoclonais ou anticorpos policlonais. Os anticorpos policlonais são aqueles produzidos por muitos linfócitos B diferentes que respondem a vários sítios antigênicos de uma proteína, quando ela é inoculada em modelo animal. Desta forma, as preparações de anticorpos policlonais contêm uma mistura de anticorpos que reconhecem partes diferentes da mesma proteína. Os anticorpos monoclonais, pelo contrário, são sintetizados por uma população de células B idênticas (um clone), produzidas em cultura “*in vitro*”. Esses anticorpos são homogêneos e reconhecem um único epítipo ou sítio antigênico (Engvall & Perlman, 1971; Engvall, 1980; Nilson, 1990; Parker, 1990).

Para o desenvolvimento do ELISA para o vírus 17DD, foram comparados dois anticorpos contra o vírus 17DD: o anticorpo policlonal M7 e o anticorpo monoclonal 2D12. Neste trabalho, foi observado que o teste utilizando o anticorpo monoclonal 2D12 apresentou as melhores condições de sensibilidade e especificidade, identificado por meio da comparação dos valores de P/N obtidos para cada anticorpo e pelo fato do anticorpo 2D12 ter sido utilizado em diluições maiores do que o anticorpo M7 (Tabelas 4.1, 4.4 e 4.5).

O ELISA é desenvolvido para reconhecer sítios antigênicos que podem estar presentes na superfície viral e que podem não ser lineares. A utilização de anticorpos monoclonais pode resultar no aumento da especificidade do teste, uma vez que uma única molécula de anticorpo pode ligar-se a uma única molécula do antígeno (Butler, 1991). Já os anticorpos policlonais fornecem uma sensibilidade mais alta devido à possibilidade de reconhecerem epítomos múltiplos em um único antígeno. No entanto, neste caso, ainda existe um risco de ocorrência de reações não específicas, pois esses anticorpos podem reconhecer epítomos presentes em proteínas não relacionadas ao antígeno de interesse. Deste modo, quando se tem um anticorpo monoclonal disponível, ele é, freqüentemente, escolhido como anticorpo primário, pois tem a capacidade de estabelecer um nível mais alto de especificidade para o ELISA. Por outro lado, o anticorpo policlonal geralmente é escolhido como anticorpo secundário (utilizado no conjugado), com a finalidade de ampliar o sinal para o reconhecimento do antígeno. Isto porque é esperado que o anticorpo secundário se ligue em epítomos diferentes do anticorpo primário. Neste contexto, todos os anticorpos candidatos devem ser testados com o antígeno pretendido com a finalidade de aperfeiçoar o teste (Butler, 1991; Butler *et al.*, 1991, Monath *et al.*, 1986).

#### **5.4. Padronização de um teste de ELISA para detecção do vírus da febre amarela: purificação dos anticorpos**

A purificação dos anticorpos utilizados neste trabalho foi realizada a partir da utilização de um método bem estabelecido e muito utilizado em laboratórios de pesquisa. A técnica consistiu na utilização de sepharose ligada à proteína A. O mecanismo de ação da proteína A é amplamente conhecido. Sabe-se que a proteína A adere com muita avidéz a anticorpos da classe IgG (Nilsson, 1990, Parker, 1990). A purificação dos anticorpos 2D12 e M7 foi obtida como demonstrado nas Figuras 4.2 e 4.3.

Outro insumo importante utilizado foi o TMB, escolhido por se apresentar mais sensível, para revelação da reação enzimática, em comparação com outros substratos como ABTS e OPD (Butler, 1991; Perlmann & Perlmann, 1994; Karaszkievicz, 2006).

Um dos grandes problemas no desenvolvimento de um ELISA é a presença de cor de fundo (reações não específicas). Sabe-se que vários fatores podem contribuir para equacionar esse problema, entre eles a utilização de um tampão de bloqueio, freqüentemente contendo concentrações baixas de um detergente não-iônico (Triton X-100 ou Tween 20) e uma proteína, cuja função é reduzir adsorção não específica de antígenos. Outro ponto importante

é a realização de um grande número de lavagens com o intuito de remoção de proteínas não específicas (Nilsson, 1990, Parker, 1990).

No desenvolvimento do teste imunoenzimático proposto neste trabalho, várias soluções de bloqueio foram testadas objetivando-se eliminar esse problema. O tampão de bloqueio escolhido foi, o mesmo utilizado no ELISA comercial para detecção de anticorpos IgM dos vírus dengue 1, 2 e 3, desenvolvido pelo DERED de Bio-Manguinhos. Esta solução ajudou na redução de reações inespecíficas e impediu a presença da cor de fundo. Além disso, o tampão de bloqueio foi utilizado como diluente das amostras e diluente do conjugado, o que contribuiu ainda mais na redução da cor de fundo.

Outro aspecto ocorrido no desenvolvimento do teste em questão, freqüentemente relatado em artigos técnicos como “efeito borda”, consiste na aparição de uma cor de fundo a partir da borda da placa para o centro. A explicação para este efeito está relacionada à dificuldade de distribuição de calor dentro da estufa ([infocociety@nunc.dk](mailto:infocociety@nunc.dk); [www.nuncbrand.com](http://www.nuncbrand.com)).

## **5.5. Produção dos controles positivo e negativo**

Outro desafio para o desenvolvimento de um ELISA é a padronização dos controles negativo e positivo. Para análise do ELISA para o vírus 17DD foi produzido um controle positivo utilizando o vírus obtido por meio de propagação em cultura de células Vero e purificado utilizando-se centrifugação em gradiente de sacarose (Putnak *et al.*, 1996a). O controle positivo foi importante para ajudar na quantificação do antígeno em questão, de modo que quanto maior o grau de pureza do controle positivo melhor seria a sua capacidade de quantificar o antígeno de interesse. A importância da obtenção de um vírus mais puro está na possibilidade de aperfeiçoamento de um teste ainda mais específico (Monath *et al.*, 1986). No presente estudo, o controle positivo foi correlacionado com a quantidade total de proteínas e com o título viral medido em PFU/mL. O ensaio contendo o controle positivo mostrou sensibilidade para detecção de amostras na diluição 1:16, contendo uma concentração de proteína de 28,95 µg/0,1 µL e um título viral de 2,95 log<sub>10</sub> PFU/0,1 mL (Figura 4.4). Deste modo, um artifício que poderia ser utilizado na quantificação de amostras do vírus 17DD atenuado seria a utilização de um parâmetro denominado unidade de ELISA (UE). Assim, uma unidade de ELISA seria equivalente a um título viral de 2,95 log<sub>10</sub> PFU/0,1 mL. A utilização da quantidade de proteína não foi um parâmetro que pode ser correlacionado com a UE, pois o vírus utilizado como controle positivo apresentou contaminação de albumina

bovina na preparação. No caso das vacinas contendo partículas virais inativadas a UE está correlacionada com resultados dos testes de dose resposta, realizados em modelo animal (Claassen *et al.*, 2003; Claassen *et al.*, 2004; Fournier-Caruana *et al.*, 2003; Dragunsky *et al.*, 2004).

## **5.6. Parâmetros necessários para validação da metodologia desenvolvida**

Para validação de um teste imunoenzimático, conforme recomenda a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), um dos fatores a ser analisado é a sua reprodutibilidade. Este teste deve poder ser reproduzido por outros laboratórios, credenciados pela ANVISA, e os parâmetros a serem analisados devem ser elaborados pelo próprio laboratório que desenvolveu o teste imunoenzimático. Neste sentido, o papel dos laboratórios credenciados é confirmar que todos os requisitos propostos são possíveis de serem alcançados. Recomenda-se que ao menos três laboratórios independentes consigam reproduzir os parâmetros pré-estabelecidos. Porém, é necessárias, uma avaliação estatística inicial de parâmetros de reprodutibilidade, repetitividade e sensibilidade do teste desenvolvido antes que seja submetido a um processo de validação externa (Fuchs *et al.*, 2003; Claassen *et al.*, 2004).

Dentre os parâmetros que devem ser analisados em um teste estão:

- a) quantidade de impurezas nos reagentes e sua potência;
- b) robustez do teste em relação à identidade, quantidade, limites, potência e composição;
- c) especificidade;
- d) definição do limite de detecção e limite de quantificação do teste.

Estes parâmetros geralmente estão definidos de acordo com os requerimentos mínimos da OMS (WHO, 1997). Assim ocorreu para validação do teste para o vírus da hepatite A (“*European Pharmacopoeia monograph*” 0870; teste A), vírus da poliomielite (Fuchs *et al.*, 2003), vírus da raiva (Rooijackers, *et al.*, 1996) e para o vírus Newcastle (Claassen *et al.*, 2003; 2004).

Em um teste visando uma avaliação da especificidade do ELISA para o vírus 17DD foram testados dois vírus da mesma família do vírus da febre amarela: os vírus da dengue sorotipo 2 (obtido em cultura de células) e o vírus da hepatite C. Os resultados comprovam que não houve reação cruzada com estes vírus que são da mesma família (Figura 4.7).

## 5.7. Características gerais de partículas virais inativadas

Dentre os métodos de inativação testados e aprovados destaca-se a inativação por formaldeído, presente em algumas das principais vacinas comerciais, como: poliomielite, raiva, hepatite A e encefalite japonesa (Singer *et al.*, 1989; Fuchs *et al.*, 2003; Claassen *et al.*, 2003; Fournier-Caruana *et al.*, 2003). Por outro lado, a cinética de inativação desses vírus por formaldeído não constitui assunto muito simples, por ser dependente de muitos fatores, incluindo sua própria concentração do vírus, o pH e a temperatura da amostra contendo vírus (Melnick, 1991). Neste trabalho, a cinética de inativação do vírus 17DD foi realizada com a finalidade de estabelecer um modelo experimental para ser testado no ELISA desenvolvido (Figura 4.10).

Sabe-se que o formaldeído favorece o aparecimento de uma certa “rigidez estrutural” nas proteínas virais, o que pode explicar o fato de gerar antígenos capazes de serem detectado em testes imunoenzimáticos. O formaldeído reage não só com os grupos amins e amidas das proteínas, como também, com os grupos amina não envolvidos em pontes de hidrogênio, nas bases purínicas e pirimidínicas do ácido nucléico. A reação induzida pelo formaldeído é descrita como uma reação de primeira ordem, onde a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração da substância que está reagindo (Hennesen, 1981).

O uso do formaldeído como agente inativante de vírus para a produção de vacinas há muito gera questionamentos devido a sua toxicidade (Moosbrugger, 1948; Graves, 1963). Os métodos moleculares de análises, introduzidos nos anos 1970, provaram que os surtos na França (1981) e em outros países da Europa Ocidental, (1980) foram associados a vacinas inativadas de forma inadequada. Porém, o formaldeído continua sendo utilizado como agente inativante, mesmo quando outros agentes com cinéticas superiores de inativação estão disponíveis (Bahnemann, 1990). Por esse motivo, outros métodos de inativação devem ser testados como: inativação por:  $\beta$ -propiolactona; glutaraldeído e pressão hidrostática. Permanecendo em aberto a possibilidade do teste desenvolvido detectar o vírus 17DD inativado por essas metodologias.

Finalmente, os resultados obtidos no presente estudo permitem indicar que o ELISA desenvolvido para detectar o vírus da febre amarela 17DD inativado é promissor. Porém, muitos outros experimentos serão necessários para estabelecer um teste ideal que seja sensível, específico e reprodutível. Nossos esforços serão concentrados para incrementar este teste com o objetivo de disponibilizá-lo para uso rotineiro na produção de uma vacina inativada.

## 6. CONCLUSÕES

---

1. O anticorpo monoclonal 2D12 (purificado) mostrou-se mais sensível e específico do que o anticorpo policlonal M7. Por este motivo, foi o anticorpo escolhido para servir como captura no teste de ELISA para o vírus 17DD;
2. O controle positivo foi obtido a partir da utilização do vírus 17DD purificado por ultracentrifugação em gradiente de sacarose, apresentando 29 $\mu$ g de proteínas virais/0,1mL;
3. A otimização da utilização do conjugado (2D12/peroxidase) para diluição 1:2000, permitiu um aumento dos valores de densidade ótica, o que tornou o resultado mais fácil de ser visualizado e com melhores discriminações entre o controle positivo e o controle negativo;
4. As diluições ideais encontradas nos insumos (anticorpo de captura 2 D12 e conjugado 2D12/Peroxidase) permitiram compor um ELISA com sensibilidade capaz de detectar proteínas virais na faixa de 1,55  $\mu$ g/0,1mL.
5. A metodologia desenvolvida mostrou-se eficaz na detecção do vírus 17DD inativado por formaldeído.

## 7. PERSPECTIVAS

---

1. Obter o vírus 17DD com grau de pureza maior do que o descrito na literatura; o que permitirá a sua otimização como controle positivo;
2. Testar o anticorpo M7 como anticorpo secundário (conjugado com peroxidase) com o objetivo de aumentar a sensibilidade do ensaio;
3. Validar a metodologia desenvolvida quanto à reprodutibilidade; sensibilidade e especificidade utilizando-se parâmetros definidos pela ANVISA e pela OMS;
4. Testar a metodologia desenvolvida para o vírus 17DD inativado por formaldeído e utilizando-se o vírus 17DD inativado por outras metodologias de inativação viral;
5. Executar um estudo de dose resposta em modelo animal para correlacionar com o ensaio desenvolvido.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Allison LMC, Mann GF, Perkins FT, Zuckerman AJ. **An accelerated stability test procedure for lyophilized measles vaccines.** Journal of Biological Standardization 1981; 9: 185–194.

Allison SL, Schalich J, Stiasny K, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. **Oligomeric rearrangement of Tick-Borne Encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH.** Journal of Virology 1995; 69: 695–700.

Allison SL, Schalich J, Stiasny K, Mandl CW, Heinz FX. **Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E.** Journal of Virology 2001; 75: 4268–4275.

Appaiahgari MB, Vrati S. **Immunogenicity and protective efficacy in mice of a formaldehyde-inactivated Indian strain of Japanese encephalitis virus grown in Vero cells.** Vaccine 2004; 22: 3669–3675.

Armstrong ME, Giesa PA, Davide JP, Redner F, Waterburu JA, Rhoad AE, Keys RD, Provost PJ, Lewis JA. **Development of the formalin-inactivated hepatitis A vaccine, VAQTA, from the live attenuated virus strain CR326F.** Journal of Hepatology 1993; 18 (Suppl. 2): 202–206.

Bahnemann HB. **Inactivation of viral antigens for vaccines preparation with particular reference to the application of binary ethyleneimine.** Vaccine 1990; 8: 299–303.

Barret ADT and Higgs S. **Yellow fever: a disease that has yet to be conquered.** The Annual Review of Entomology 2007; 52: 209–229. Annu. Rev. Entomol. 2007.52. Downloaded from arjournals.annualreviews.org by CAPES on 10/07/06. For personal only. Coletado no dia 09/08/2006 às 9:55.

Barret ADT. **Yellow fever vaccines.** Bulletin de L'Institut Pauster 1987; 85: 103–24.



Benchimol, JL. **Febre amarela: a doença e a vacina, uma história inacabada**. Rio de Janeiro: Editora Fundação Oswaldo Cruz 2001.

Bradford MM.. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Analalys Biochemistry* 1976; 72: 248–54.

Budowsky DT. **Problems and prospects for preparation of killed antiviral vaccines**. *Advances in Vírus Research* 1991; 39: 255–290.

Butler M, Buergener A, Patrick M, Berry M, Moffatt D, Huzel N, Barnabé N, Coombs K. **Application of a serum-free médium for the growth of vero cells and the production of reovirus**. *Biothechnol Prog* 2000; 16(5): 854–8.

Butler JE. **Perspectives, configurations and principles**. In Butler JE, ed., *Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay*. Boca Raton, Fl., CRC, Press, 3–26.

Butler JE, Joshi KS and Brown WR. **The application of traditional immunochemical methods to evaluate the performance of capture antibodies immobilized on microtiter wells**. In: Butler JE., ed., *Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay*. Boca Raton, Fl., CRC Press, 221–231.

Burke DS, Monath TP. **Flaviviruses**. In: DM Knipe, PM Howley, DE Griffin, RA Lamb, MA Martin, B Roizman, SE Straus (eds). *Fields Virology* 4<sup>o</sup> ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia/New York 2001; 1: 1044–1125.

Buss, PM, Carvalheiro JR, Temporão JG. **Vacinas, Soros e Imunizações no Brasil**. Editora Fiocruz 2005.

Camargo IF, Gaspar AMC, Yoshida CFT. **Comparative ELISA reagentes for detection of hepatitis B surface antigen (HBsAg)**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1987; 82(2): 181–187.

Camacho LA, de Aguiar SG, Freire Mda S, Leal Mda L, do Nascimento JP, Iguchi T, Lozana JA, Farias RH. **Reactogenicity of yellow fever vaccines in a randomized, placebo-controlled trial.** Revista de Saúde Pública 2005; 39 (3): 413–420.

Carol S, Frederick K, Grace B, Michael K, Ron L, Gerald V. Quinnan Jr. **Quantification of poliovirus antigens in inactivated viral vaccines by enzyme-linked immunosorbent assay using animal sera and monoclonal antibodies.** Journal of Biological Standardization 1989; 17: 137–150.

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. **Flaviviruses genome organization, expression and evolution.** Animal Review in Microbiology 1990a; 44: 649–688.

Chambers TJ, Weir RC, Grakoui A, McCout DW, Bazan JF, Fletterick RJ, Rice CM. **Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein.** Proceedings of the National Academy of Science United States of America 1990b; 87(22): 8898–8902.

Chan RC, Penney DJ, Little D, Carter IW, Roberts JA, Rawlinson WD. **Hepatitis and death following vaccination with 17D-204 yellow fever vaccine.** The Lancet 2001; 358: 121–122.

Chang GJ, Kuno G, Purdy D E, Davis B S. **Recent advancement in flavivirus vaccine development.** Expert Review of Vaccines 2004; 3(2): 199–220.

Chiong MA. **Dr. Carlos Finlay and yellow fever.** The Journal of Clinical Investigation 1989; 116, 10: 141.

Claassen I, Maas R, Daas A, Milne C. **Feasibility study to evaluate the correlation between results of a candidate in vitro assay and established in vivo assays for potency determination of Newcastle disease vaccines.** Pharmeuropa Bio 2003; (1): 51–66.

Claassen I, Maas R, Oei H, DaasA, Milne C. **Validation study to evaluate the reproducibility of a candidate in vitro potency assay of Newcastle disease vaccines and to establish the suitability of a candidate biological reference preparation.** Pharmeuropa Bio 2004; (1): 1–15.

Conner ME, Crawford SE, Barone C, O'Neal C, Zhou YJ, Fernandez F, Parwani A, Saif LJ, Cohen J, Estes MK. **Rotavirus subunit vaccines**. Archives of Virology 1996; 199–206.

Davis DR, Padlan EA, Sheriff S. **Antibody-antigen complexes**. Annu Rev Biochem, 1990; 59, 439–473.

De Madrid AT & Potterfield JS. **A simple micro-culture method for the study of group B arboviroses**. Bulletin of World Health Organization 1969; 40: 113–121.

Dragunsky EM, Ivanov AP, Wells VR, Ivshina AV, Rezapkin GV, Abe S, Potapova SG, Enterline JC, Hashizume S and Chumakov KM. **Evaluation of immunogenicity and protective properties of inactivated poliovirus vaccines: a new surrogate method for predicting vaccine efficacy**. Journal of Infectious Disease 2004; 190 (8): 1404–412.

Engvall E. **Enzyme immunoassay ELISA and EMIT**. Meth. Enzymol 70, 1980, 419–439.

Engvall E, Perlman P. **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin**. G. Immunochemistry 1971; 8: 871–879.

Eugenia MD, Alexander PI, Virgen RW, Anna VI, Gennady VR, Shinobu A, Svetlana GP, Joan CE, Sou H, Konstantin MC. **Evaluation of immunogenicity and protective properties of inactivated poliovirus vaccine: A new surrogate method for predicting vaccine efficacy**. The Journal of Infection Diseases 2004; 190: 1404–12.

Finlay C. **El mosquito hipoteticamente considerado como agente de transmission de la fiebre amarilla**. Anales de la Real Academia de Ciências Medicas Físicas Naturales. 1881; 18: 147.

Fournier-Caruana J, Poirier B, Haond G, Jallet C, Fuchs F, Tordo N, Perrin P. **Inactivated rabies vaccine control and release: use of an ELISA method**. Biologicals 2003; (1): 9–16.

Frahia Neto H. **O recente reencontro do *Aedes aegypti* em Belém, Pará**. Ver. Paul. Méd. 1967; 71: 259.

Franco O. **História da febre amarela no Brasil**. Ministério da Saúde, Departamento Nacional de Endemias Rurais, DNER, Rio de Janeiro 1969; 97–103.

Frazatti-Gallina NM, Mourão-Fuches RM, Paoli RL, Silva MLN, Miyaki C, Valentini EJJ, Raw I, Higashi HG. **Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free médium**. *Vaccine* 2004; 23: 511–517.

Fuchs F, Minor P, Daas A, Milene C. **Establishment of European Pharmacopoeia BRP batch 2 for inactivated poliomyelitis vaccine for in vitro D antigen assay**. *Pharmeuropa Bio* 2003; (1): 23–50.

FUNASA. **Plano de Intensificação das Ações de Prevenção e Controle de Febre Amarela**, Brasília 2006; 6.

Galler R, Pugachev KV, Santos CLS, Ocran WS, Jabor AV, Rodrigues SG, Marchevsky RS, Freire MS, Almeida LFC, Cruz ACR, Yamamura AMY, Rocco IM, Travassos da Rosa ES, Souza LTM, Vasconcelos PFC, Guirakhoo F, Monath TP. **Phenotypic and molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil**. *Virology* 2001; 290: 309–319.

Goers J. **Immunochemical techniques laboratory manual**. United Kingdom Edition published by Academic Press limited 1993; pg 119–135.

Gorgas MD. **William Crawford Gorgas: His life and Work**, Doubleday, Garden City, NY, 1924: 98.

Graves JH. **Formaldehyde inactivation of foot-and-mouth disease virus as applied to vaccine preparation**. *American Journal of Veterinary Research* 1963; 24: 1131– 1135.

Gubler DJ. **The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle?** *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2004; 27(5): 319–330.

Heather L. Van Epps, **Broadening the horizons for yellow fever: new uses for na olde vaccine**. *JEM The Rockefeller University Press*. 2005; Vol 201, N<sup>o</sup>. 2, January 17, 2005, 165–168. [www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20042565](http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20042565).

Hennesen W. **Inactivation of poliovirus**. *Dev Biol Stand* 1981; 47: 139–42.

Karaszkiwicz JW. **Critical factors in immunoassay optimization**. Ph.D. Manager, Technical Service and Application Dvelopment 2006; KPL, Inc. [ww.kpl.com BenchMarks](http://ww.kpl.com BenchMarks).

Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature 1970; 277: 680–685.

Lequin RM. **Enzyme Immunoassay (EIA)/ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).** Clinical Chemistry 2005; 51: 2415–2418.

Lloyd W, Theiler M Ricci NI. **Modification of virulence of yellow fever virus by cultivation in tissues *in vitro*.** Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene 1936; 29: 481–529.

Marchevsky RS, Leal ML, Homma A, Coutinho ESF, Camacho LAB, Jabor AV, Galler R, Freire M. **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 and additional passage in chicken embryos.** Biologicals 2005: 1–7.

Maas R, van Diepen M, Komen M, Oei H, Claassen I. **Antigen content of inactivated Newcastle disease oil emulsion vaccines as an *in vitro* indicator of potency.** Developments in Biologicals 2002; 111: 313–318.

Martin M, Tsai TF, Cropp B, Chang GJ, Holmes DA, Tseng J, Shieh W, Zaki SR, Al-Sanouri I, Cutrona AF, Ray G, Weld LH, Cetron MS. **Fever and multisystem organ failure associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of four cases.** Lancet 2001;358: 98–104.

Martins RM, Galler G, Freire MS, Camacho LAB, Maia MLS, Homma A. **Yellow fever vaccination: Some thoughts on howmuch is enough [Vaccine 23 (2005) 3908–3914].** Vaccine 25 (2007) 10–11.

Melnick JL. **Virus inactivation: lesson from the past.** Dev Biol Stand 1991; 52: 1–23.

Merten OW, Manuguerra JC, Hannoun C, VanderWerf S. **Production of influenza virus in serum-free mammalian cells cultures.** Developments in Biological Standardization 1999; 98: 23–37.

Monath TP, Nystrom RR. **Detection of yellow fever virus in serum by enzyme immunoassay**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1984a; 33(1): 151–157.

Monath TP. Yellow Fever. In: **Vaccines** 1999; Plotkin, SA. e Mortimer, EA. Eds. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia. W. B. Saunders Company, Harcourt Brace Javanovich, Inc. p.815-879.

Monath TP. **Yellow fever vaccine**. Review. Expert Review Vaccines 2005; 4(4) 1–22. [www.future-d.com](http://www.future-d.com).

Moosbrugger GA. **Recherches expérimentales sur la fièvre aphteuse**. Schweizer Archiv für Tierheilkunde 1948; 90: 176–198.

Nakane PK & Kawaoi A. **Peroxidase labeled antibody, a new method of conjugation**. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 1974; 22: 1084–1091.

Nicolau AR. **Desenvolvimento da vacina contra febre amarela em cultura de tecido**. Simpósio Internacional sobre febre amarela e dengue. *Cinqüentenário da Introdução da cepa 17D no Brasil* 1988; 168–169.

Nilsson, B. **Enzyme-linked immunosorbent assays**. Curr. Opin. Immunol 1990; 2: 898–904.

Norrby, E. **Prospects for new viral vaccines**. Microbiological Sciences 1987; 4(7): 202–205.

Pan American Health Organization. **Pan American Sanitary Bureau, Regional Office of the WORLD HEALTH ORGANIZATION Scientific and Technical Publication** 2005; no. 603.

Parker, CW. **Immunoassays**. Meth. Enzymol 1990; 182: 700–718.

Perlmann H and Perlmann P. **Enzyme-Linked immunosorbent assay**. In: Cell Biology: A laboratory handbook. 1994; San Diego, CA, Academic Press, Inc., 322–328.

Post PR. **Biologia molecular do vírus da febre amarela**. DSc Thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil 1996; 104.

Post PR, Carvalho R, Freire MS, Galler R. **The early use of yellow fever virus strain 17D for vaccine production in Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2001; 96: 849–857.

Putnak R, Cassidy K, Conforti N, Lee R, Sollazzo D, Truong T, Ing E, Dubois D, Sparkuhl J, Gastle W, Hoke C. **Immunogenic and protective response in mice immunized with a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype made in fetal rhesus lung cells.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1996a; 55:504–510.

Putnak R, Barvir DA, Burrous JM, Dubois DR, D’Andrea VM, Hoke CH, Sadoff JC, Eckles H. **Development of a purified, inactivated, Dengue-2 virus vaccine prototype in Vero cells: Immunogenicity and protection in mice and Rhesus monkeys.** The Journal of Infectious Diseases 1996b; 174: 1176–1184.

Putnak JR, Collier BA, Voss G, Vaughn DW, Clements D, Peters I, Bignami G, Hough HS, Chen RCM, Barvir DA, Seriwatana J, Cayphas S, Garçon N, Gheysen D, Kanesa-athan N, McDonnell M, Humpherys T, Eckels KH, Prieels JP, Innis BL. **An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model.** Vaccine 2005; 23: 4442–4452.

Rice CM, Lenches E, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. **Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution.** Science 1985; 229: 726–733.

Rice CM. Flaviviridae: **The viruses and their replication.** In: Virology 1996; vol. 1. Fields BN & Knipe DM, Howley, PM *et al.* eds, 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia. Lippincott-Raven Publishers, 931–1033.

Rooijackers E, Groen J, uittenbogaard J, van Herwijnen J and Osterhaus A. **Development and evaluation of alternative testing methods for the in vivo NIH potency test used for the quality control of inactivated rabies vaccines.** Developments in Biological Standardization 1996; (86): 137–45.

Sawyer WA, Bauer JH, Whitman L. **Distribution of yellow fever immunity in North America, Central America, West Indies, Europe, Asia and Australia, with special reference to specificity of protection test.** American Journal of Tropical Medicine 1930; 17: 137–161.

Sawyer WA. **Persistence of yellow fever immunity.** Journal Prev. Med. 1931; 5: 413–428.

Schatzmayr HG. **Novas perspectivas em vacinas virais.** História, Ciência e Saúde – Manguinhos, 2003; 10 (suplemento 2) 655–69.

Schlesinger JJ, Brandriss MW, Monath TP. **Monoclonal Antibodies Distinguish between Wild and Vaccine Strains of Yellow Fever Virus by Neutralization, Hemagglutination Inhibition, and Immune Precipitation of the Virus Envelope Protein.** Virology 1983; 125: 8–17.

Singer C, Knauert F, Bushar G, Klutch M, Lundquist R and Quinnan GV. **Quantification of poliovirus antigens in inactivated viral vaccines by enzyme-linked immunosorbent assay using animal sera and monoclonal antibodies.** Journal of Biological Standardization 1989; 17(2): 137–150.

Smith HH, Penna HA, Paoliello A 1938. **Yellow fever vaccination with cultered virus (17D) without immune serum.** American Journal of Tropical Medicine 1938; 18(5): 437–468.

Smith PK, Krohn RJ, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klink DC. **Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid.** Analytical Biochemistry 1985; 150, 76–85.

Soper FL. **Vacinação contra a Febre Amarela no Brasil, de 1930 a 1937.** *Arquivos de Higiene VII*: 1937; 379–390.

Soper FL. - *Febre Amarela. Separata de “O Hospital”.* Oficinas Gráficas de A NOITE. Fundação Rockfeller, Rio de Janeiro, 1942.



Stanley MA. **Human papillomavirus vaccines.** Rev. Med. Virology 2006; 16: 139–49. Review.

Stiasny K, Allison SL, Marchler-Bauer A, Kunz C, Heinz FX. **Structural Requirements for low-pH induced rearrangements in envelope glycoprotein of Tick-Borne Encephalitis Virus.** Journal of Virology 1996; 70: 8142–8147.

Struchiner CJ, Luz PM, Dourado I, Sato HK, Aguiar SG, Ribeiro JGL, Soares RCR, Codeço CT. **Risk of fatal adverse events associated with 17DD yellow fever vaccine.** Epidemiology and Infection 2004; 132(5): 939–946.

Sugawara K, Nishiyama K, Ishikawa Y, Abe M, Sonoda K, Komatsu K, Horikawa Y, Takeda K, Honda T, Kuzuhara S, Kino Y, Mizokami H, Mizuno K, Oka T, Honda K. **Development of Vero Cell-Derived Inactivated Japanese Encephalitis Vaccine.** Biologicals 2002; 30: 303–314.

Theiller M, Smith HH. **The effect of prolonged cultivation *in vitro* upon the pathogenicity of yellow fever virus.** Journal of Experimental Medicine 1937a; 65: 767–86.

Theiller M, Smith HH. **Use of Yellow fever virus modified by *in vitro* cultivation for human immunization.** Journal of Experiment Medicine 1937b; 65: 787–800.

Vasconcelos PFC, Luma EJ, Galler R, Silva LJ, Coimbra TL, Barros VLRS, Monath TP, Rodrigues SG, Laval C, Costa ZG, Vilela MFG, Santos CLS, Papaiordanou CMO, Alves VA, Andrade LD, Sato HK, Rosa EST, Fraguas GB, Lacava E, Almeida LMR, Crus ACR, Rocco IM, Santos RTM, Oliva OFP. **Serious adverse associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases.** Lancet 2001; 358: 91–97.

Vasconcelos PFC, Bryant JE, Travassos da Rosa APA, Tesh RB, Rodrigues SG, Barret ADT. **Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus, Brasil.** Emerging Infectious Disease 2004; 110, 9.

WHO – **A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements.** Part 2: Validation. Global Training Network. World Health Organization. Geneva, 1997.

WHO – World Health Organization / Global Programme for Vaccines and Immunization / Expanded Programme on Immunization. **Yellow fever**. Geneva 1998, Report series: 1–87.

WHO – World Health Organization. **Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases**. 2000. WHO/CDS/CSR/ISR/2000.1 ([http://www.who.int/emc-documents/surveillance/docs/whocdscsr2001.html/Yellow\\_fever/Yellow\\_Fever.htm](http://www.who.int/emc-documents/surveillance/docs/whocdscsr2001.html/Yellow_fever/Yellow_Fever.htm)).

WHO – World Health Organization. **Yellow Fever in 2003**. Weekly Epidemiological Record 2003; 78: 349–360.

WHO – World Health Organization. **Initiative for vaccine Research 2004-2005**. Strategic Plan. Immunization, Vaccines and Biologicals. 2004.

WHO – World Health Organization. **Progress in the control of yellow fever**. Weekly Epidemiological Record 2005a; 80, 50–54.

WHO – World Health Organization. **Progress in the control of yellow fever in Africa**. Weekly Epidemiological Record 2005b; 80, 49–60.

WHO – World Health Organization. **Yellow fever situation in Africa and South America, 2005**. Weekly Epidemiological Record 2006; 81, 317–324.

Sites Consultados:

- <http://www.Saude.gov.br/portal/svs/default.cfm>. Coletado em novembro de 2006.

- <http://www.pheur.org/site>. Coletado Julho 2006.

- Bulletin No. 1 of Nunc. **Edge effect in microwell<sup>TM</sup> ELISA**. Enviado Janeiro 2006.