

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*Alice Gomes Fernandes*

Padronização e validação de método de RT-PCR em tempo real para o vírus de febre amarela vacinal e cinética de replicação viral *in vitro*.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Mestre em Ciências

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup>. Constança Felícia De Paoli de Carvalho Britto

**RIO DE JANEIRO**

Dezembro de 2012

**FICHA CATALOGRÁFICA A SER ELABORADA PELA BIBLIOTECA  
CENTRAL DE MANGUINHOS PARA A VERSÃO FINAL DA TESE (A ser  
impressa no verso da primeira folha de rosto)  
INDICAR APENAS AS PALAVRAS-CHAVE NA VERSÃO APRESENTADA  
PARA A DEFESA PÚBLICA DA TESE**

Fernandes, AG

Padronização e validação de método de RT-PCR em tempo real para o vírus de febre amarela vacinal e cinética de replicação viral *in vitro*.

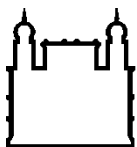
Rio de Janeiro: 2012.

p.; il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Parasitária, 2012.

1. Flavivírus 2. Vírus da febre amarela. 3. Febre amarela 4. qRT-PCR; 5. Vírus 17DD  
I. Título

CDD:



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*Alice Gomes Fernandes*

Padronização e validação de método de RT-PCR em tempo real para o vírus de febre amarela vacinal e cinética de replicação viral *in vitro*.

**ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup>. Constança Britto**

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bispo de Filippis**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Myrna Bonaldo**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Debora Regina Lopes dos Santos**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Andrea Cheble de Oliveira**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Flavia Barreto dos Santos**

Rio de Janeiro, 01 de Dezembro de 2012

Dedico este trabalho

Aos meus amados pais Áurea e Almério Fernandes, aos meus irmãos, ao meu querido namorado Maurício e a minha querida orientadora por toda força, estímulo e paciência durante esta etapa da minha vida.

## **Agradecimentos**

- A minha chefe Anna Maya Yoshida pela oportunidade de realizar este meu grande sonho que foi o mestrado, por todo apoio, carinho e principalmente pela paciência de me escutar, sempre se mostrando muito gentil e amável.

- Ao Dr. Marcos Freire por acreditar em mim, me dando oportunidade de participar deste mestrado, que muito contribuiu para minha formação profissional;

- A minha orientadora Dra. Constança Britto, pela credibilidade e carinho ao me receber como aluna, pela rica orientação, por todo o aprendizado proporcionado ao longo deste processo e a impecável correção da dissertação;

- A Dr<sup>a</sup>. Sheila Lima, somente em palavras é difícil descrevê-la. O fato de sempre confiar e acreditar em mim, mesmo nos momentos de desânimo me deu força e garra para alcançar meus objetivos me ajudou a chegar até aqui. Você sempre foi amiga, gentil e companheira e com isso consegue tirar o melhor das pessoas, logo, você foi imprescindível na minha vida não só como uma mentora, mas como uma grande .

- A minha companheira Dr<sup>a</sup>. Gisela Trindade pelo apoio, cumplicidade e amizade nas horas de desânimo, agradeço também a paciência com as crises e choradeiras, além de suas imprescindíveis contribuições para a realização deste mestrado;

- A todo o LATEV, minha segunda família, pela amizade e apoio a cada dia. Trabalhar com pessoas tão queridas torna a rotina muito mais leve e agradável. Um abraço especial a Ana Carolina Reis, Ana Cláudia Duarte, Waleska Schwarcz, Emily Hime e Ivanildo Souza pela amizade, risadas e conforto nos momentos de desânimo. Aos meus queridos amigos do setor de célula, Renan, Renata, Viviane, Lecila e Liliane, por sempre me ajudar nas horas de desespero com palavras amigas

e encorajadoras, além de um trabalho impecável que favoreceu aos ótimos resultados obtidos nos meus experimentos. Especialmente a minha querida amiga e companheira de trabalho Kelly Araújo, sem você eu jamais teria realizado esse sonho, palavras como força e apoio são pouco para descrever o que você significou talvez o termo seja fada madrinha.

- Ao Laboratório de Biologia Molecular e Doenças endêmicas pela utilização de suas instalações e apoio em experimentos. Um agradecimento especial ao Dr. Otacílio Moreira, por todo o apoio e prestatividade em todas as etapas experimentais. Obrigada pelo exemplo de motivação frente aos mais diferentes obstáculos;

- A companheira de turma de mestrado Renata Carvalho pelas risadas e principalmente ter alguém para poder compartilhar o desespero em cada disciplina. A Leilane, Alexandre, Diana, Raquel, Renatinha, Fernanda, Tônico e Hugo, companheiros nesta jornada de pós-graduação;

- Aos amigos de toda a vida, em especial Camilla Bayer e Karen Romay pela compreensão com a ausência nestes dois anos de intensa dedicação. Aos meus queridos Carolzinha, Mala, Fi, por sempre estarem presentes me dando força. Aos meus amigos Laura e Frango, pelas noites de desconfio. Ao Maurilio que aturava meus devaneios. Ao meu amigo Carlinhos que me entende tão bem. À Caroline Baptista, Henrique, Leandro, Vanessa e Anália, pelas bagunças e longas conversas.

- À plataforma de sequenciamento do IOC por toda a assessoria prestada;

-Ao Dr. Marcelo Ribeiro Alves, pela assessoria na parte de estatística;

- A Dr.<sup>a</sup> Vanessa Salete de Paula, pela assessoria em todo processo de clonagem, essencial para a realização deste trabalho;

- Um agradecimento em especial a minha mãe *Áurea*, que sempre esteve ao meu lado, me criou, me ensinou valores que eu levarei por toda a minha vida, sempre me aceitou da forma que eu sou, sempre batalhou e sim mãe essa vitória é sua. Agradeço ao meu pai *Almério* que me sustentou, tolerou meus choros e reclamações sempre com uma palavra descontraída para acalantar todos os males e nunca deixou de acreditar em mim. A minha irmã *Amanda* por todo o carinho e apoio em todos os desafios assumidos ao longo da minha vida, obrigada por ser uma irmãzona. Ao meu irmão *Gabriel*, por todo o mal humor aturado no dia a dia Obrigada a vocês por todo o amor e exemplos de determinação dados. A minha avó *Edith*, pelo carinho que sempre teve comigo; A minha amada avó *Zenithe* (*in memorian*), pelo seu amor e dedicação que mesmo com a sua ausência tão precoce na minha vida ficarão guardados em meu coração até o fim de meus dias, seus ensinamentos e a luz que você trouxe em minha vida me guiarão para sempre, espero que onde você esteja, sinta orgulho de mim. Vocês são tudo na minha vida;

- Ao meu namorado *Maurício* a quem eu amo tanto, por toda a cumplicidade, paciência, estímulo nos momentos de desânimo e madrugadas acordando cedo com a minha insônia nervosa. Por me fazer muito feliz todos os dias, me dando força e motivação para superar os mais diversos obstáculos. Agora já podemos casar né?;

- A todos aqueles que de alguma forma contribuíram com uma palavra amiga ao longo deste trabalho.

A única forma de chegar ao impossível é acreditar que é possível.

(LEWIS CARROLL)



## Abreviaturas e Siglas

17D	Cepa original vacinal do vírus da Febre Amarela desenvolvida através da atenuação de uma cepa selvagem
17DD	Cepa vacinal do vírus da Febre Amarela produzido por Bio-Manguinhos –Fiocruz
17D-204	Outra cepa vacinal obtida através de subcultivo da cepa 17D
AEFI	Vigilância de eventos adversos após a imunização
AP61	Célula do mosquito <i>Aedes pseudoscutellaris</i>
ATCC	Coleção Americana de Culturas. Do inglês: “ <i>American Type Culture Collection</i> ”
BHK-21	Célula de rim de hamster recém-nascido
Biomanguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
BLAST	Ferramenta bioinformática utilizada para alinhamento de sequências de dados genômicos, transcriptômicos e proteômicos, do inglês “ <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> ”
C	Capsídeo
C6/36	Células do mosquito <i>Aedes albopictus</i> clone C6/36
cDNA	Ácido desoxiribonucléico complementar
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CHKV	Vírus Chikungunya
CMC	Carboximetilcelulose
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
Ct	Ciclo onde a reação cruza o limiar de detecção ( <i>threshold</i> ) do inglês: “ <i>ciclo threshold</i> ”
CV	Coeficiente de variação
DEN	Dengue
DENV	Vírus Dengue
DNA	Ácido desoxiribonucléico
D.O.	Densidade ótica
D.P.	Desvio Padrão

D.P.I.	Dias após a infecção
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato, do inglês: “ <i>Nucleoside triphosphate</i> ”
ddNTP	Dideoxiribonucleotídeo
dsDNA	DNA fita dupla, do inglês “ <i>double strand DNA</i> ”
E	Envelope
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético. Do inglês: “ <i>Ethylenediaminetetraaceticacid</i> ”
Eff	Eficiência
ELISA	Ensaio imuno-enzimático, do inglês: “ <i>Enzime-Linked Immunosorbent Assay</i> ”
EtBr	Brometo de etídeo
EXO IPC	Controle interno exógeno
EPC	Equipamento de proteção coletiva
EPI	Equipamento de proteção individual
FA	Febre amarela, do inglês: “ <i>Yellow fever</i> ”
FDA	Órgão governamental norte americano responsável pelo controle dos alimentos, suplementos alimentares, medicamentos, cosméticos, equipamentos médicos, materiais biológicos e produtos derivados do sangue humano. do inglês: “ <i>Food and Drug Administration</i> ”
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FNV	Vacina neurotrópica francesa
FVV	Vírus viscerotrópico francês
g	Gramas
H <sub>2</sub> O	Hidróxido de hidrogênio, água
HBsAg	Antígeno de superfície do Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HEPES	Tampão. Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês: “ <i>Human Immunodeficient Virus</i> ”
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G

INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IPC	Controle positivo interno, do inglês: “ <i>internal positive control</i> ”
JEV	Vírus da Encefalite Japonesa, do inglês: “ <i>Japanese Encephalitis Virus</i> ”
kDa	Kilodalton
KCl	Cloreto de potássio
LABIMDOE	Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas
LATEV	Laboratório de Tecnologia Viroológica
LB	Meio Luria Bertani
LD	Limite de detecção
LLC-MK2	Célula de rim de macaco <i>Rhesus</i>
Log	Logarítmo
Log <sub>10</sub>	Logarítmo de base 10
LQ	Limite de quantificação
MuV	Vírus da Caxumba, do inglês: “Mumps vírus”
MV	Vírus do Sarampo, do inglês: “ <i>Measles vírus</i> ”
M	Membrana
µg	Micrograma
mg	Miligrama
µL	Microlitro
mL	Mililitro
M.O.I.	Multiplicidade de infecção do inglês: “ <i>Multiplicity of Infection</i> ”
mol	Unidade de base do Sistema Internacional de Unidades (SI) para a grandeza quantidade de matéria ou de substância
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCR	Região não codificante. Do inglês: “ <i>Non Coding Region</i> ”
nM	Nanomolar
NS	Proteína não estrutural
NTC	Controle negativo da reação de PCR, do inglês “ <i>No template control</i> ”

ng	Nanograma
nt	Nucleotídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Fase de leitura aberta. Do inglês: “ <i>Open Reading Frame</i> ”
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês: “ <i>Polymerase chain reaction</i> ”
PFU	Unidade Formadora de Placa, do inglês: “ <i>Plaque forming unit</i> ”
pH	Potencial hidrogeniônico
PNI	Programa nacional de imunização
prM	precursor da proteína de membrana
qRT-PCR	Transcrição Reversa seguida pela reação em cadeia polimerase quantitativa
R <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
RE	Retículo Endoplasmático
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotação por minuto
RT	Transcrição Reversa, do inglês: “ <i>Reverse Transcription</i> ”
RT-PCR	Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia pela Polimerase
SAE	Reação Adversa Severa, do inglês: “ <i>serious adverse event</i> ”
SEVAN	Seção de Validação Analítica
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TBE	Tris-borato-EDTA
TGN	Rede trans-Golgi
tRNA	RNA transportador
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTR	Região não Traduzida, do inglês: “ <i>untranslated region</i> ”
VERO	Células de rim de macaco verde africano
WHO	Organização Mundial da Saúde. Do inglês: <i>World Health Organization</i>

YEL-AND	Doença neurotrópica associada à vacina, do inglês: <i>“yellow-fever associated neurologic disease”</i>
YEL-AVD	Doença viscerotrópica associada à vacina, do inglês: <i>“yellow-fever associated viscerotropic disease”</i>
VFA	Vírus da Febre Amarela, do inglês <i>“Yellow fever vírus”</i>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.1</b>	Modelo esquemático da partícula do <i>flavivírus</i> .	4
<b>Figura 1.2</b>	Ciclo de replicação dos <i>flavivírus</i> .	5
<b>Figura 1.3</b>	Organização do genoma da poliproteína precursora dos flavivírus	7
<b>Figura 1.4</b>	Mapa da Organização Mundial da Saúde com recomendação para a vacinação da febre amarela e países com risco.	9
<b>Figura 1.5</b>	Ciclo de transmissão do vírus da febre amarela selvagem, urbano e intermediário (savana) na América do Sul e África.	12
<b>Figura 1.6</b>	Vacina para o vírus da febre amarela 17DD	17
<b>Figura 1.7</b>	Comparação entre sistema TaqMan® e SYBR® Green.	24
<b>Figura 4.1</b>	Sistemas de produção de antígenos virais.	34
<b>Figura 4.2</b>	Esquema do vetor plasmidial e sítio de clonagem.	41
<b>Figura 4.3</b>	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, descritos por Bae e cols. 2003, usados para a comparação com a região NS5.	50
<b>Figura 5.1</b>	Fórmula para conversão da concentração obtida em g/uL para número moléculas/uL.	54
<b>Figura 5.2</b>	Curva padrão com 8 pontos.	55
<b>Figura 5.3</b>	Curva padrão com 6 pontos.	56

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 4.1</b>	Sonda TaqMan® e iniciadores usados na validação, alvo para a região NS5 de Febre amarela (YFV) (Mantel e cols, 2008)	39
<b>Tabela 4.2</b>	Reagentes empregados para a reação da RT-PCR convencional, para um volume final de 25 µL.	39
<b>Tabela 4.3</b>	Ciclagem térmica usada na RT-PCR convencional.	39
<b>Tabela 4.4</b>	Esquema com a variação da concentração dos oligonucleotídeos iniciadores em nanoMolar (nM).	44
<b>Tabela 4.5</b>	Condições da mistura de reação dos reagentes para o ensaio de otimização da concentração de sonda TaqMan.	45
<b>Tabela 4.6</b>	Ciclagem térmica da RT-qPCR. Etapas com respectivos tempos e temperaturas usadas.	45
<b>Tabela 4.7</b>	Reagentes empregados para a reação da RT-qPCR para um volume final de 25 µL.	46
<b>Tabela 4.8</b>	Ciclagem térmica da RT-qPCR. Etapas com respectivos tempos e temperaturas usadas.	48
<b>Tabela 4.9</b>	Reagentes empregados para a reação da RT-qPCR em multiplex para um volume final de 25 µL.	49
<b>Tabela 4.10</b>	Ciclagem térmica da RT-qPCR. Etapas com respectivos tempos e temperaturas usadas.	49
<b>Tabela 4.11</b>	Reagentes empregados para a reação da RT-qPCR em multiplex para um volume final de 25 µL.	50
<b>Tabela 4.12</b>	Concentração dos reagentes do ensaio usando o sistema SYBR® Green de RT-qPCR.	51
<b>Tabela 4.13</b>	Ciclo da PCR em tempo real com respectivos tempos e temperaturas utilizados.	51
<b>Tabela 5.1</b>	Determinação dos limites de quantificação (LQ) e detecção (LD).	59
<b>Tabela 5.2</b>	Resultados em cópias/reação dos ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade do painel sorológico	60

(vírus reconstituído em soro).

<b>Tabela 5.3</b>	Resultados em cópias/reação dos ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade do painel de amostras clínicas.	61
<b>Tabela 5.4</b>	Análise da especificidade do método.	62
<b>Tabela 5.5</b>	Análise estatística realizada pelo SEVAN.	63
<b>Tabela 5.6</b>	Valores de Ct para o alvo da RNase P e para a região NS5 do vírus febre amarela (VFA) nas amostras analisadas	64
<b>Tabela 5.7</b>	Cinética de propagação viral em garrafa estacionária.	68
<b>Tabela 5.8</b>	Cinética de propagação viral em biorreatores.	68
<b>Tabela 5.9</b>	Cinética 1 e 2 da curva de propagação viral em <i>Cell Factory</i> .	70
<b>Tabela 5.10</b>	Estimativa da carga viral dos animais vacinados com a vacina 17DD para o vírus da febre amarela empregando ensaios de placa de lise (PFU/mL) e RT-qPCR (cópias/mL).	73



## Lista de gráficos

<b>Gráfico 5.1</b>	Análise comparativa entre, a curva quantificada por plaque e a curva plasmidial adotada posteriormente.	56
<b>Gráfico 5.2</b>	Variação das concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores, valores de Ct encontrados para a mesma concentração de vírus ( $10^4$ cópias/ reação) e seus respectivos desvios padrão.	57
<b>Gráfico 5.3</b>	Variação da concentração da sonda, valores de Ct encontrados para a mesma concentração de vírus ( $10^4$ cópias/ reação) e seus respectivos desvios padrão.	58
<b>Gráfico 5.4</b>	Análise da precisão intermediária a partir do painel sorológico contendo amostras com carga viral alta de $10^4$ cópias/reação, média com $10^3$ cópias/reação e baixa $10^2$ cópias/reação do vírus de febre amarela, adicionadas ao soro humano e seus respectivos desvios padrão.	60
<b>Gráfico 5.5</b>	Análise da precisão intermediária a partir do painel de amostras clínicas, representadas em três concentrações do vírus da febre amarela: alta com carga viral de $10^3$ cópias/reação, média com $10^2$ cópias/reação e baixa com 50 cópias/reação do vírus da febre amarela e seus respectivos desvios padrão.	61
<b>Gráfico 5.6</b>	Análise comparativa dos valores de Ct para as concentrações do vírus da Febre Amarela 17DD diluído em soro humano negativo (curva padrão YFV) e em soro contendo em conjunto os vírus da Caxumba, Dengue 1, 2 e 3 e Sarampo (curva padrão YFV + pool viral).	63

<b>Gráfico 5.7</b>	Amostras de biorreator analisadas para os alvos da região NS5 do vírus da febre amarela (YFV) e para o EXO IPC (controle exógeno).	65
<b>Gráfico 5.8</b>	Análise do desempenho dos iniciadores para as regiões NS3, 3'UTR e NS5 do vírus da febre amarela, empregando o sistema SYBR Green de RT-qPCR.	66
<b>Gráfico 5.9</b>	Análise da cinética de propagação viral em garrafa estacionária.	67
<b>Gráfico 5.10</b>	Análise da propagação viral em biorreatores referente ao 4 <sup>o</sup> dia após a inoculação.	69
<b>Gráfico 5.11</b>	Cinética 1 da curva de propagação viral em <i>Cell Factory</i> .	69
<b>Gráfico 5.12</b>	Cinética 2 da curva de propagação viral em <i>Cell Factory</i> .	70
<b>Gráfico 5.13</b>	Avaliação da carga viral referente ao animal AD69.	71
<b>Gráfico 5.14</b>	Avaliação da carga viral referente ao animal AD07.	72
<b>Gráfico 5.15</b>	Avaliação da carga viral referente ao animal AC70.	72
<b>Gráfico 5.16</b>	Avaliação da carga viral referente ao animal AE13.	73
<b>Gráfico 5.17</b>	Análise estatística do valor obtido em todas as amostras analisadas no tópico 5.11, com o vírus da febre amarela 17DD em PFU/mL Log <sub>10</sub> e seu correspondente em Cópias/mL Log <sub>10</sub> .	74

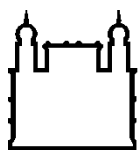
## Índice

RESUMO	XXIV
ABSTRACT	XXV
1.) INTRODUÇÃO	1
1.1) Histórico da Febre Amarela	1
1.2) O Vírus	3
1.2.1) Classificação e Morfologia	3
1.2.2) Estrutura do Genoma e expressão Gênica	3
1.3) Epidemiologia	8
1.3.1) Ciclo de Transmissão e Distribuição Geográfica	10
1.4) Patogenia e Quadro Clínico	13
1.5) Prevenção	15
1.5.1) Vacina	15
1.5.2) Efeitos Adversos	18
1.6) Diagnóstico Laboratorial	21
1.6.1) Reação de Transcrição Reversa acoplada à Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)	22
1.7) Validação	26
2.) JUSTIFICATIVA	30
3.) OBJETIVOS	31
3.1) Objetivos gerais	31
3.2) Objetivos específicos	31
4.) MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1) Amostras	32
4.2) Células Vero	33
4.3) Propagação viral	34
4.4) Curva de propagação viral em garrafa estacionária	34
4.5) Purificação do vírus	35
4.6) Titulação do Vírus da FA 17DD por Contagem de Placas de Lise em Meio Semi-Sólido	35
4.7) Biossegurança	36
4.8) Extração de RNA	37

4.9) Síntese da cadeia complementar	37
4.10) Clonagem para obtenção das amostras padrão de Quantificação	37
4.10.1) Crescimento de células <i>Escherichia coli</i>	39
4.10.2) Preparo das células competentes de <i>E. coli</i>	39
4.10.3) Transformação	41
4.10.4) Extração do DNA plasmidial de <i>Escherichia coli</i> TOP10	42
4.10.5) Quantificação do DNA Plasmidial	42
4.11) Otimização da concentração dos oligonucleotídeos e sonda	43
4.12) PCR em tempo real	44
4.13) Construção da curva padrão	45
4.14) Determinação da sensibilidade do teste	45
4.15) Precisão intermediária	46
4.16) Especificidade	46
4.17) Especificidade analítica	47
4.18) Gene de Referência	47
4.18.1) Controle interno endógeno	47
4.18.2) Controle interno exógeno	48
4.19) Teste de diferentes oligonucleotídeos iniciadores	49
4.20) Correlação entre PFU/mL e Cópias/mL	50
4.21) Análise estatística	51
5.) RESULTADOS	53
5.1) Clonagem	53
5.2) Obtenção da Curva padrão	53
5.3) Otimização dos oligonucleotídeos iniciadores e sonda	56
5.3.1) Otimização dos oligonucleotídeos iniciadores para a região NS5 viral	56
5.3.2) Otimização da sonda TaqMan para a região NS5 viral	56
5.4) Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação	57
5.5) Precisão intermediária	58
5.6) Avaliando a especificidade	60
5.6.1) Especificidade	60

5.6.2) Especificidade Analítica	61
5.7) Validação	62
5.8) Gene de referência	63
5.9) Controle Interno Exógeno	64
5.10) Teste dos Oligonucleotídeos Iniciadores	65
5.11) Correlação entre os ensaios de quantificação por PFU/mL e Cópias/mL	66
5.11.1) Curva de propagação viral em garrafa estacionária	66
5.11.2) Cinética de propagação viral em biorreatores.	67
5.11.3) Cinética de propagação viral em <i>Cell Factory</i> .	68
5.11.4) Amostras clínicas de primatas não humanos	70
5.11.5) Análise estatística	72
6.) DISCUSSÃO	74
6.1) Validação da metodologia de RT-qPCR para o vírus da febre amarela	74
6.1.1) Avaliando a linearidade	75
6.1.2) Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).	76
6.1.3) Avaliando a Precisão Intermediária	76
6.1.4) Avaliando a especificidade	78
6.2) Gene de referência	80
6.3) Controle interno exógeno	80
6.4) Análise Comparativa dos oligonucleotídeos iniciadores	81
6.5) Correlação entre PFU/mL e Cópias/mL	82
6.5.1) Curva de propagação viral em garrafa estacionária	82
6.5.2) Curva de propagação viral em biorreator	83
6.5.3) Curva de propagação viral em <i>Cell Factory</i>	83
6.5.4) Amostras clínicas de primatas não humanos	84
7.) CONCLUSÕES	85
8.) PERSPECTIVAS	86
9.) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

Rio de Janeiro, 01 de novembro de 2012



Ministério da Saúde

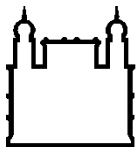
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE RT-PCR EM TEMPO REAL PARA O VÍRUS DE FEBRE AMARELA VACINAL E CINÉTICA DE REPLICAÇÃO VIRAL *IN VITRO*.**

### **RESUMO**

O desenvolvimento e a produção de vacinas virais, de uma forma geral, envolvem diversas etapas que necessitam do monitoramento da carga viral ao longo de todo processo. Essas etapas vão desde a produção do antígeno, purificação, inativação, liofilização, testes pré-clínicos e clínicos e uma vez o produto licenciado, um processo de farmacovigilância contínuo se faz necessário. Atualmente em Biomanguinhos essas etapas são monitoradas pelo ensaio de titulação em placa de lise que leva em torno de sete a dez dias. Com o recente desenvolvimento do qRT-PCR em tempo real (qRT-PCR), temos disponível uma abordagem mais rápida para este monitoramento, que pode ser feito em poucas horas. Dentro deste contexto, desenvolver, padronizar e validar uma técnica que permita quantificar o vírus da febre amarela de forma rápida e eficaz em todas as etapas acima descritas é de extrema importância na otimização deste processo. Para tal foi construída uma curva padrão plasmidial e parâmetros como linearidade, precisão intermediária e especificidade foram avaliados. Além disso, foi definido o limite de detecção e quantificação do teste. Para garantir a qualidade do teste foram estabelecidos controles exógenos e endógenos, a fim de evitar resultados falso negativos. A análise estatística dos dados de quantificação viral, nos revelam uma excelente correlação entre os resultados obtidos em cópias de RNA/mL quantificados por qRT-PCR e o título viral calculados em ensaios de plaque ( $R = 0.96$ ), além da obtenção de um fator de correlação, para conversão dos valores de PCR em tempo real para plaque. A análise dos resultados demonstrou que os experimentos da validação atendem a todos os parâmetros definidos pelo setor de qualidade. Esta técnica se mostrou eficiente para determinação da carga viral do vírus da febre amarela tanto em amostra *in vivo* quanto *in vitro*, tornando-se assim uma ferramenta muito importante em todos os projetos desenvolvidos no LATEV e podendo inclusive, no futuro ser adotada como padrão ouro nas análises laboratoriais e de controle de qualidade dos lotes vacinais.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

STANDARDIZATION AND VALIDATION OF METHOD FOR RT-PCR REAL TIME TO YELLOW FEVER VIRUS VACCINE AND KINETICS OF VIRAL REPLICATION *IN VITRO*.

### ABSTRACT

The development and the production of viral vaccines, in general, involve several steps that need the monitoring of viral load throughout the entire process. These steps range from the production of antigen, purification, inactivation, lyophilization, preclinical testing and clinical trials and once the licensed product, a process of continued pharmacovigilance is needed. Nowadays in Biomanguinhos these steps are monitored by plaque titration assay lysis which takes about seven to ten days. With the recent development of real time RT-PCR, we have available a faster approach to this, where monitoring can be done in a few hours. In this context, the development, standardization and validation of a technique to quantify the yellow fever virus quickly and efficiently in all the stages described above is extremely important in optimizing the process. To do this end we constructed a plasmid standard curve and parameters such as linearity, intermediate precision and specificity were evaluated. Furthermore, we defined the limit of detection and quantification of the test. To ensure the quality of the test, endogenous and exogenous controls were established in order to avoid false negative results. The statistical analysis to quantify viral load revealed an excellent correlation between the results obtained in RNA copies / mL quantified by qRT-PCR and the viral titer calculated as plaque tests ( $R = 0.96$ ). In addition, a correlation factor for conversion of the real time PCR data to plaque was generated. In general, the results analysis showed that the validation experiments gathered to all parameters defined by the quality sector. The technique herein standardized proved to be effective for determining yellow fever viral load both in vivo and in vitro, thus becoming a very important tool in all projects developed in LATEV, and may eventually be adopted as the gold standard laboratory analysis and quality control for vaccine production.

# 1. Introdução

## 1.1. Histórico da Febre Amarela

A febre amarela é uma doença que teve origem na África e foi importada para Europa e Américas através do tráfico negreiro que existia entre esses continentes (Barrett e Monath, 2003). Até recentemente questionava-se a origem do vírus; não se sabia se ele já existia na América antes do comércio de escravos vindos da África. Pesquisas utilizando ferramentas moleculares indicam que as amostras de vírus de febre amarela das Américas perderam parte de uma sequência repetitiva do genoma na região 3' não codificante, o que não ocorre nas amostras africanas, inclusive na vacina 17D e na amostra protótipo Asibi da qual derivou a amostra vacinal (Barret, 1997; Mutebi e cols., 2001; Wang e cols, 1996; Zanotto e cols., 1996). Isto praticamente encerra a polêmica, indicando que o vírus se originou na África (Vasconcelos, 2003).

No hemisfério ocidental, o primeiro registro epidemiológico de febre amarela acredita-se ter sido em Yucatan no México, em 1648 (Carter, 1931). Um manuscrito Maya descreve como *xekik* (vômito negro), que é uma manifestação característica de febre amarela severa. O termo febre amarela foi provavelmente usado por Griffin Hughes no seu livro História Natural de Barbados (1750). Uma descrição de um surto no Haiti em 1945 foi aparentemente causada por febre amarela. Surto ocorreram também no sul como em Montevideu, Uruguai e Tocopilla, Chile e no norte como em Quebec, Canadá (Vainio e Cutts, 1998; Barret e Higgs, 2007).

Através dos séculos XVIII e XIX ocorreram surtos de febre amarela em regiões tropicais devastadas nas Américas do Sul e Central, assim como em cidades pobres na costa leste da América do Norte e na Europa (Tomlinson e Hodgson, 2005). No século 18, houve a maior epidemia de febre amarela em muitas cidades da América, onde a doença levou a óbito 10% da população da Filadélfia em 1793 (Monath, 1996).

No Brasil, a febre amarela surgiu no final do século 17; desde então, essa doença tornou-se a principal moléstia epidêmica do país. Durante o período colonial,



o país sofreu com sucessivas epidemias: em 1685, surgiram epidemias em Olinda e em outros municípios de Pernambuco, além de um grande surto na Bahia, em 1686 (Teixeira, 2001). A epidemia que irrompeu em meados do século XIX na capital do Império brasileiro foi atribuída à chegada de um navio negreiro procedente de Nova Orleans, tendo feito escalas em Havana e Salvador antes de atracar no Rio de Janeiro, em dezembro de 1849. Fato relevante que foi decisivo para o desenvolvimento da epidemia, foi a instalação do *Aedes aegypti* na cidade do Rio de Janeiro. Em fevereiro de 1850, a febre amarela se apossara da cidade e das praias da região. Segundo estimativa, atingiu 90.658 habitantes do Rio de Janeiro, causando 4.160 mortes, de acordo com os dados oficiais. Foi então constituída a Junta de Higiene Pública, que, em 1886, transformou-se em Inspetoria Geral de Higiene e Inspetoria Geral de Saúde dos Portos (site Fiocruz; Ferreira e cols, 2011).

A etiologia e a forma de transmissão continuaram uma incógnita por muitos anos. Durante a guerra Hispano-Americana de 1898, uma severa epidemia de febre amarela começou entre os camponeses cubanos e soldados americanos que estavam em Havana (Monath, 1996). Carlos Finlay, um cientista cubano, foi o primeiro a determinar no final do século XVII que mosquitos eram responsáveis pela disseminação da doença. Enviado para Cuba pelo governo dos Estados Unidos para investigar a causa da febre amarela, Walter Reed e colegas confirmaram que a forma de transmissão primária para humanos era o mosquito *Aedes aegypti*, e em um inovador estudo científico foi demonstrado que a doença era causada por um agente filtrável do sangue de indivíduos infectados (Staples e Monath, 2008).

O trabalho de combate até a erradicação da febre amarela urbana, no Brasil, durou mais de 50 anos. Entre os responsáveis pelo processo, poderia ser citado o médico Emílio Marcondes Ribas, que antecedeu Oswaldo Cruz no combate ao vetor transmissor da doença (Vigilância epidemiológica, 1999). Foi a partir de 1903, quando Oswaldo Cruz foi nomeado Diretor Geral de Saúde Pública, que foi criado o Serviço de Profilaxia da febre amarela. Foram quase 50 anos de luta para que, em 1942, fossem notificados os últimos casos de febre amarela urbana no Brasil (Benchimol, 1944).

Campanhas para a erradicação do *Aedes aegypti*, em Cuba e no Panamá foram bem sucedidas na eliminação de casos urbanos de febre amarela (Staples e Monath, 2008; Gardner e Ryman, 2010) e no Brasil o impacto destas campanhas foi

positivo até 1970, quando o *Aedes aegypti* voltou a infestar o território brasileiro (Monath, 2008; Ferreira e cols, 2011). Infelizmente, a erradicação da doença foi frustrada pelo fato da febre amarela ser uma doença zoonótica (Gardner e Ryman, 2010), que garante a manutenção de seu ciclo selvagem nas espécies selvagens de mosquito e nos primatas não humanos nas florestas da América do Sul e na África, como o *Haemagogus* na América do Sul e o *Aedes* na África (Rice e cols, 1985).

## **1.2. O Vírus**

### **1.2.1. Classificação e Morfologia**

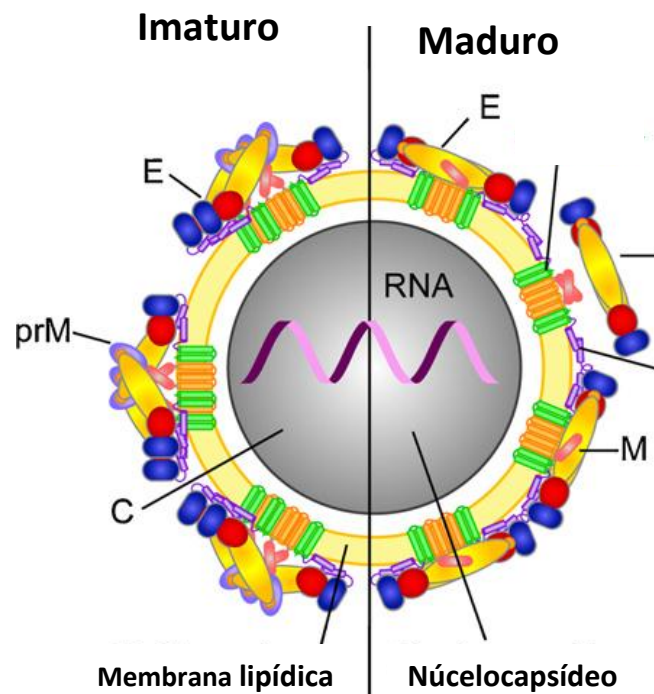
O vírus da febre amarela é um vírus do gênero *Flavivirus*, da família Flaviviridae. Este gênero e família consistem de um grupo de 70 agentes patogênicos humanos e veterinários causadores de sérias doenças, incluindo a febre do dengue, encefalite japonesa e febre amarela (FA). Embora apenas um sorotipo do vírus amarelado seja reconhecido, há pequenas alterações genéticas entre as cepas da América e da África que permitem atualmente caracterizar dois e cinco genótipos, respectivamente, não se sabendo se um é mais patogênico que o outro (Mutebi e cols., 2001; Wang e cols, 1996).

### **1.2.2. Estrutura do Genoma e Expressão Gênica**

O vírus da febre amarela possui um genoma constituído de RNA de fita simples não segmentado, polaridade positiva, com 11 kilobases de comprimento. O genoma completo possui 10.862 nucleotídeos que codificam 3.411 aminoácidos. Esse genoma possui uma única região codificante (ORF) com aproximadamente 10.233 nucleotídeos que codifica a síntese de proteínas virais e que é flanqueada por duas regiões não codificantes (NCR) de tamanhos variáveis, sendo uma grande a 3'NC, com 511 nucleotídeos, e uma menor 5'NCR que possui 118 nucleotídeos.

As regiões não codificantes, não sintetizam proteínas virais, mas são importantes para a regulação e expressão do vírus (Rice et al., 1985).

O nucleocapsídeo (Figura 1.1) tem o diâmetro de 25-40nm e é envolvido pelo envoltório bilaminar de natureza lipoproteica, conhecido como envelope e que é originário da célula hospedeira. A partícula íntegra (vírion mais envelope) mede cerca de 40-50nm com uma superfície externa relativamente lisa que é construída com as proteínas de envelope (E) e as proteínas de membrana (M) (Chambers e cols., 1990). A região codificante do RNA viral expressa a síntese de três proteínas estruturais (prM, E e C) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Rice e cols., 1985).

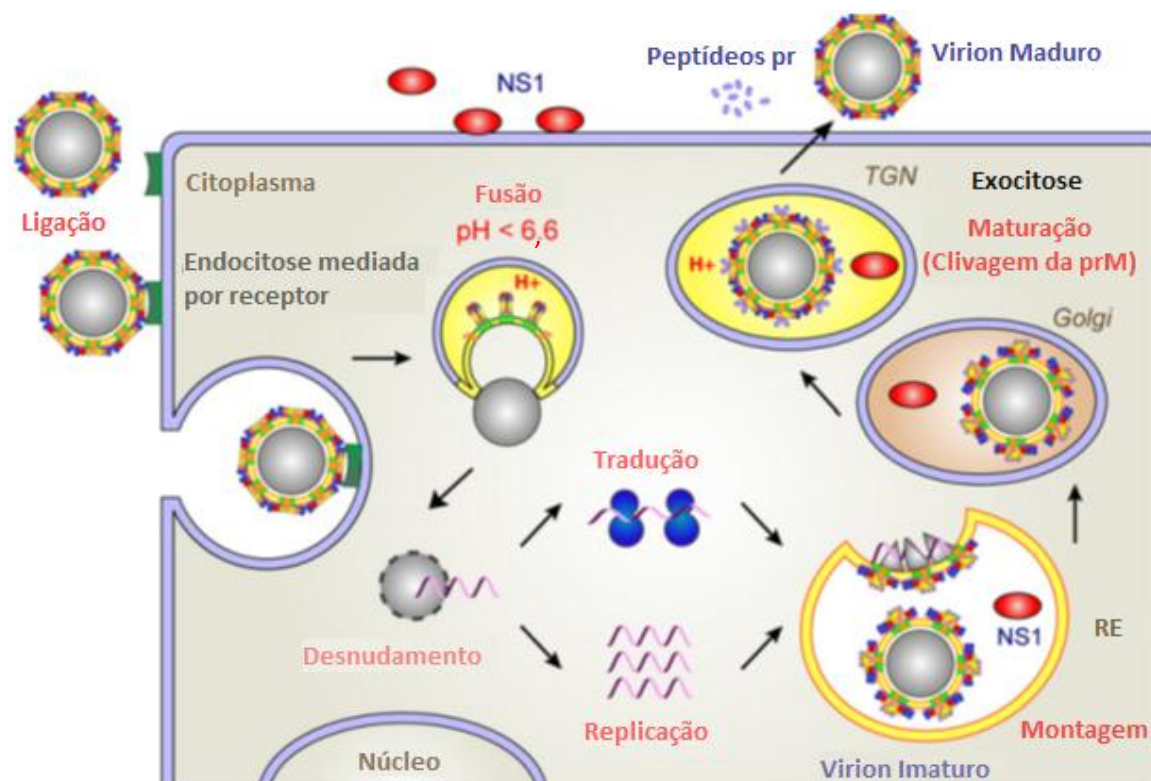


**Figura 1.1.** Modelo esquemático da partícula do *flavivírus*. A partícula viral é pequena, icosaédrica e envelopada. Esquerda: vírus imaturo, direita: vírus maduro. O genoma de RNA fita simples infeccioso é empacotado em um nucleocapsídeo icosaédrico com um envelope lipídico e proteínas virais, prM/M e E. O capsídeo esférico contém o RNA viral e múltiplas cópias da proteína C do capsídeo. Figura extraída e adaptada de Heinz e Stiasny, 2012.

As proteínas estruturais codificam a formação da estrutura básica da partícula viral; a proteína prM codifica o precursor da proteína de membrana (M), a proteína E dá origem ao envelope e a proteína C codifica a formação do capsídeo viral (Rice e cols., 1985; Briton, 1986). Ao serem sintetizadas, as proteínas E e prM

se associam formando heterodímeros que são incorporados nos vírions imaturos que brotam do lúmen do retículo endoplasmático (RE) para a periferia da célula (Figura 1.2). Interações entre os heterodímeros prM e E são importantes para o enovelamento correto de E e provavelmente também para a proteção do vírion imaturo contra a inativação ácida durante o transporte através das vesículas ácidas (Op De Beeck e cols, 2003).

A proteína E é responsável pela ligação do vírus a célula hospedeira, através da fusão mediada por receptor e induzida por pH do envelope viral com a membrana celular hospedeira. Esta fusão resulta na liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula infectada (Alisson e cols., 2001; Crill e Roehrig, 2001; Lindebach e Rice, 2001).



**Figura 1.2.** Esquema do ciclo replicativo dos *flavivirus*. O vírus penetra na célula por endocitose mediada por receptor, ocorre a fusão no endossoma induzida pelo baixo pH. A fita positiva do RNA é traduzida em três proteínas estruturais e sete não estruturais, que são essenciais para o processamento da poliproteína e replicação do RNA. A montagem do vírus ocorre no retículo endoplasmático (RE), levando à formação de partículas não infecciosas imaturas, que são transportadas através da via exocitótica da célula. O pH ácido na rede trans-Golgi (TGN) provoca um rearranjo das proteínas do envelope e a clivagem proteolítica de prM em pr e M pela protease celular furina. Pr permanece associado com

estas partículas e se dissocia sendo liberado após a exocitose das partículas infecciosas por exocitose. Extraído e adaptado de Heinz e Stiasny, 2012.

As proteínas não estruturais são responsáveis pelas atividades reguladoras e pela replicação, virulência e patogenicidade do vírus (Chambers e cols., 1990). Elas são compostas por proteínas de alto peso molecular e altamente conservadas: NS1, NS3 e NS5 assim como por proteínas menores e hidrofóbicas que são pouco conservadas: NS2A, NS2B, NS4A e NS4B (Figura 1.3) (Pastorino e cols., 2010).

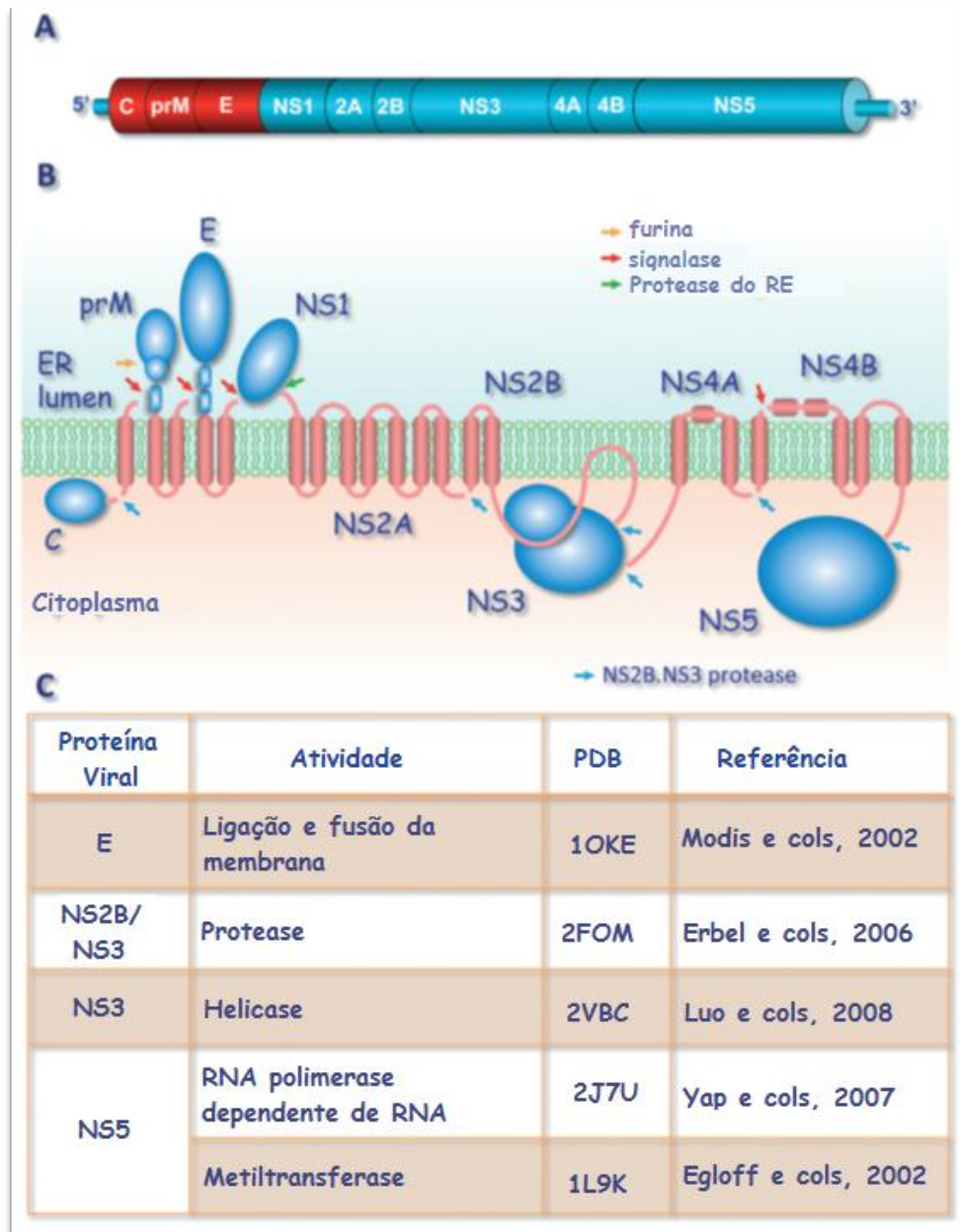
A glicoproteína NS1 está associada à membrana, formando dímeros que ficam na membrana da célula (Westaway, 1987) em contato com o meio extracelular, está envolvida na maturação viral, participa da patogênese inibindo a ativação da cascata do sistema complemento e corresponde ao antígeno fixador de complemento participando na indução de anticorpos específicos usando receptor Fc via mecanismos dependentes e independentes (Schlesinger e cols., 1990).

As proteínas NS2A e NS2B são pouco conservadas. Enquanto a NS2A está provavelmente associada a maturação de NS1, a NS2B é um possível componente da protease/replicase e atua na formação de componentes do capsídeo durante a replicação. A NS3 é multifuncional, estando a porção serino-protease localizada no N-terminal que atua com o cofator NS2B no processamento da poliproteína, enquanto a porção helicase/NTPase situada no C-terminal atua na separação da fita simples de RNA (dependente de ATP) durante a replicação. As proteínas NS4A e NS4B são pouco conservadas. Estão associadas à membrana e são possíveis componentes da replicase (Mackenzie, 2005).

A proteína NS5, tem um peso molecular de 103 kDa. É a maior e mais conservada proteína dos Flavivírus. NS5 tem duas atividades separadas codificadas em distintos domínios que contêm sequências de localização nuclear. Os 300 aminoácidos do N-terminal da NS5 representa o domínio metiltransferase, que metila a estrutura cap (capeamento do RNA) e os 605 aminoácidos do C-terminal contém o domínio RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), que tem um importante papel na amplificação do RNA viral (Davidson, 2009).

Diferente da DNA polimerase e de muitas RNA polimerases, a RNA polimerase da família *Flaviviridae* inicia a síntese de RNA *in vivo* via um mecanismo *de novo*, no qual um segundo NTP é adicionado diretamente ao primeiro NTP 3'-OH

(com a liberação de sua porção pirofosfato) sem a necessidade de um iniciador (Choi e Rossmann, 2009).



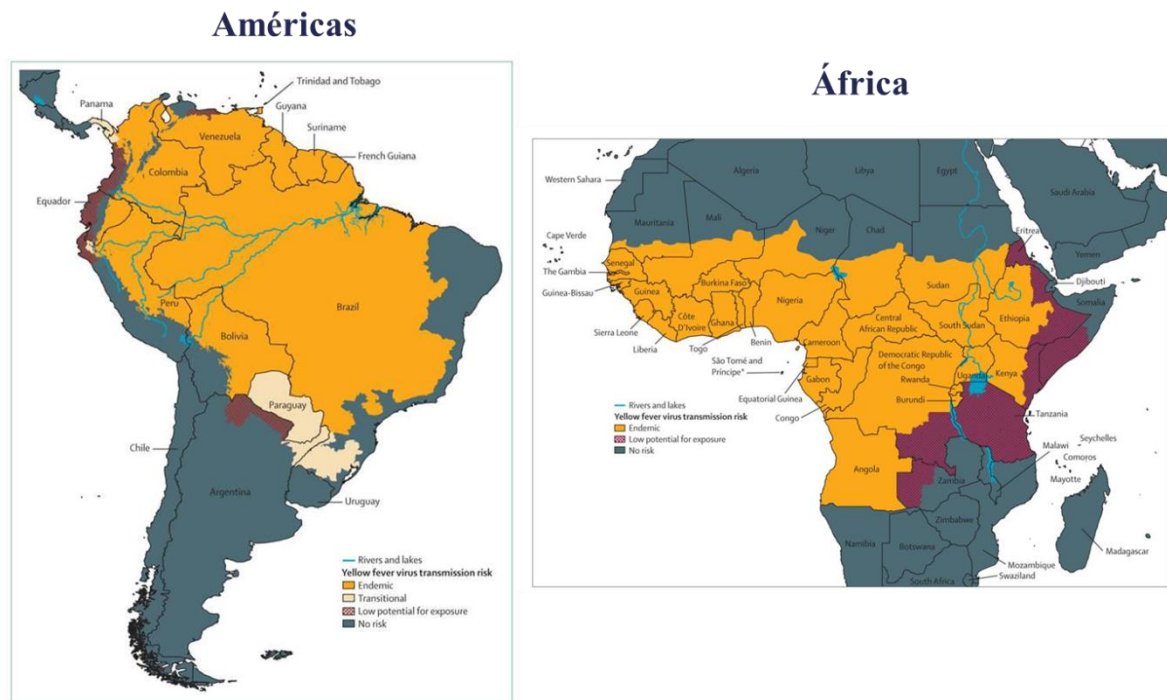
**Figura 1.3.** Organização do genoma da poliproteína precursora dos flavivírus. **A:** Esquema do genoma de *flavivírus*. **B:** Poliproteína do *flavivírus* expressa em associação com o retículo endoplasmático (RE) e a clivagem co-traducional pelas proteases virais e do hospedeiro. A proteína prM é processada em M através de uma furina clivada imediatamente após a saída da célula. **C:** Atividades funcionais e o código do PDB (Banco de Dados de Proteínas) que contém a estrutura cristalográfica das proteínas. Parte das proteínas dos flavivírus já tiveram sua estrutura molecular determinada, fato importante para o desenvolvimento de fármacos terapêuticos (Extraído e adaptado de Young, 2010).

A replicação do RNA ocorre na membrana do retículo endoplasmático associada ao complexo de replicação que compreende ambas as proteínas, viral e celular. Os dois maiores componentes desse complexo são as proteínas NS3 e NS5, que fornecem propriedades enzimáticas vitais para a replicação do RNA (Lindebach, Thiel e Rice, 2007). Durante a replicação, os vírus também recrutam fatores celulares que são componentes normais no processamento ou tradução do RNA celular (Lai, 1998). Nos últimos anos, foi reportado que a proteína NS5 interage com várias proteínas do hospedeiro para a replicação viral (García-Montalvo, Medina e del Angel, 2004; Qing e cols., 2009; Yocupicio-Monroy e cols., 2007). A NS5 pode interagir com fatores celulares relacionados com vias do interferon, proliferação celular e a permeabilidade da junção, sugerindo que a NS5 provavelmente está envolvida na patogênese viral (Ashour e cols., 2009; Ellenrona, Syed e Johansson, 2009; Lin e cols., 2006; Mazzon e cols., 2009; Werme, Wigerius e Johansson, 2008; Bronzoni e cols, 2011).

### **1.3. Epidemiologia**

A África responsabiliza-se por mais de 90% dos casos de febre amarela anualmente notificados à OMS. Isto corresponde a cerca de 5000 casos anuais. Na América do Sul estima-se a ocorrência de 300 casos anuais (Robertson e cols., 1996).

Todo ano cerca de 9 milhões de pessoas da Ásia, Europa e América do Norte viajam para países onde a febre amarela é endêmica (Figura 1.4); o número de viajantes que realmente visitam áreas onde ocorre a transmissão do vírus pode exceder os 3 milhões. Viajantes não vacinados, que visitam áreas na África durante os períodos epidêmicos, possuem um risco estimado de contrair a doença de 1 a cada 267 indivíduos, e risco de morte de 1 em 1333, apesar do risco ser menor durante os períodos não epidêmicos. O risco de contrair a doença e morte para a América do sul chega a ser dez vezes menor que na África, devido à taxa de transmissão selvagem ser menor na América do Sul. Entretanto, o risco de contrair a febre amarela vai depender da época do ano, do itinerário e atividades, a densidade populacional do vetor e a circulação do vírus na região (Monath e Cetron, 2002).



**Figura 1.4.** Mapa da Organização Mundial da Saúde com recomendação para a vacinação da febre amarela e países com risco. Fonte: <http://www.cdc.gov/yellowfever/maps/index.html> Disponível em 14/3/12.

A mortalidade global da febre amarela situa-se entre 5-10% dos casos, percentual elevado quando comparado a outros vírus, inclusive o dengue (Taylor, 1951). Mas a letalidade dos casos graves revelou-se maior e no Brasil oscila entre 40%-60% (Vasconcelos e cols., 2001; Vasconcelos e cols., 2001; Vasconcelos e cols., 1997). Nos últimos 31 anos do século XX, cobrindo o período de 1970-2001, foram notificados 4.543 casos de febre amarela na América do Sul, todos da forma silvestre. O Peru, com 2.341 casos (51,5%) e a Bolívia com 912 casos (20,1%) são os dois países que mais reportaram casos. O Brasil ocupa o terceiro lugar com 849 casos (18,7%) notificados no período (Pan American Health Organization, 2002). A situação do Brasil preocupa. Na última década, o número anual de casos notificados raramente excedeu 60 notificações, mas a letalidade mostrou-se elevada e a tendência tem sido de aumento do número de ocorrências (Vasconcelos e cols., 1999).

No Brasil, o vírus da febre amarela está presente principalmente nas regiões Norte e Centro-Oeste, e na parte pré-amazônica do Maranhão, sendo estas regiões endêmicas, com uma população sob risco de, aproximadamente, 30 milhões de pessoas (Vasconcelos, 2002; Albuquerque, 2007). Na região Sul e nos Estados de



Minas Gerais e São Paulo, a circulação do vírus é limitada, sendo esta área denominada de área de transição ou epizoótica (Albuquerque, 2007). Esta faixa foi ampliada e atualmente abrange também áreas do Piauí e da Bahia (Albuquerque, 2007; Guia de vigilância epidemiológica, 2005). A ampliação da zona epizoótica tem sido motivo de grande preocupação para as áreas de saúde pública, uma vez que, à medida que se ampliam essas zonas, aumentam as chances da reinstalação da febre amarela urbana, particularmente em associação com a presença do *Aedes aegypti*, vetor da doença urbana.

### 1.3.1. Ciclo de Transmissão e Distribuição Geográfica

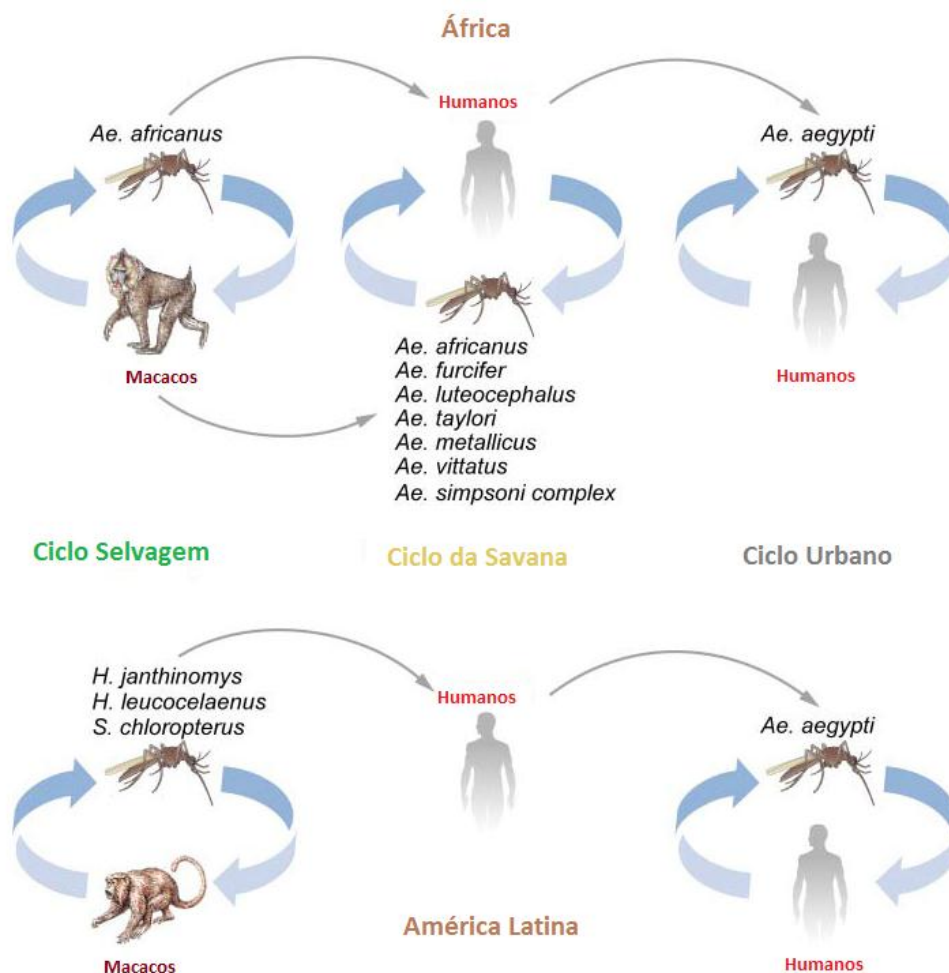
Reconhecido na década de 1930, o ciclo selvagem (Figura 1.5), consiste na transmissão do vírus entre primatas não humanos e várias espécies de mosquitos silvestres que habitam nas copas de árvores (Robertson, 1996). No ciclo urbano (Figura 1.6), a transmissão acontece diretamente entre mosquitos e humanos, sem a necessidade de hospedeiros reservatórios, estando o próprio homem atuando como amplificador e disseminador do vírus na população (WHO, 2010; Jentes e cols, 2011). Em geral, também é o homem que introduz o vírus na área urbana. Uma vez introduzido em ambiente urbano, o paciente infectado desenvolverá viremia, podendo expressar a doença e servir de fonte de infecção a novos mosquitos. Assim o ciclo se perpetua, até que se esgotem os indivíduos suscetíveis ou se realize a vacinação em massa da população a fim de conter a transmissão. (Vasconcelos, 2000).

Na África, a transmissão também pode ocorrer em um ciclo intermediário (ciclo de Savana) entre humanos, primatas não humanos e mosquitos *Aedes* spp que se alimentam em savanas e árvores (WHO, 2010; Jentes e cols, 2011) (Figura 1.5). Na África Oriental há um vetor de ligação entre os ciclos urbano e silvestre, representado pela espécie *Aedes simpsoni*, infectando os indivíduos da periferia das cidades, e, mantendo a transmissão urbana contínua, ainda que limitada a essas áreas (World Health Organization, 1985).

Os mosquitos além de serem transmissores são os reservatórios do vírus, pois uma vez infectados assim permanecem por toda vida, ao contrário dos

macacos que, como os homens, ao se infectarem morrem ou curam-se, permanecendo imunes (Vasconcelos, 2000). Nos mosquitos também ocorre a transmissão vertical do vírus, onde os mosquitos fêmeas produzem ovos contaminados, como um mecanismo de manutenção do ciclo (WHO, 1998; Domingo e cols., 2012).

Tanto na África quanto na América, os hospedeiros silvestres primários do vírus da febre amarela são primatas não humanos (Brés, 1986; Strode, 1951). No Novo Mundo, todos os gêneros de primatas não humanos reconhecidos e infectados experimentalmente, se mostraram sensíveis e suscetíveis ao vírus da febre amarela (Strode, 1951). Corroborando esses achados, revela-se comumente a presença de anticorpos contra a febre amarela em símios capturados (Vasconcelos, 2003).



**Figura 1.5.** Ciclo de transmissão selvagem, urbano e intermediário (savana) na África e América do Sul. O ciclo selvagem envolve a transmissão do vírus entre primatas não humanos e espécies de mosquitos encontrados no dossel florestal. O vírus é transmitido para os seres humanos quando estes se encontram em atividades de turismo ou trabalhando na selva. No ciclo intermediário (Savana) ocorre a transmissão do vírus dos

mosquitos para humanos que vivem ou trabalham nas regiões de fronteira da selva. Nesse ciclo, o vírus pode ser transmitido do macaco para o humano ou de humano para humano através dos mosquitos. O ciclo urbano envolve a transmissão do vírus entre humanos e mosquitos urbanos, principalmente *Aedes aegypti*. O vírus é normalmente trazido para o cenário urbano por um ser humano virêmico que foi infectado na selva ou savana. (Extraído e adaptado de Barret e Higgs, 2007).

Suspeita-se que outros animais, como os marsupiais arbóreos e preguiças, possam ter papel secundário no ciclo de manutenção viral, especialmente em áreas onde os macacos estejam ausentes ou já imunes ao vírus (Monath, 1988).

#### **1.4. Patogenia e Quadro Clínico**

O caminho percorrido pelo vírus, após atingir o organismo do hospedeiro pela picada do transmissor, é sua chegada nos linfonodos regionais, onde irá se replicar em linfócitos e macrófagos, desaparecendo, assim, da circulação por 24 horas. Após realizar seu ciclo replicativo, as partículas virais deixam as células e caem na corrente linfática até atingirem a corrente sanguínea, caracterizando o período de viremia e atingindo finalmente o fígado. Este é o principal órgão acometido na febre amarela, onde as células de Kupffer e os hepatócitos são infectados (Vasconcelos, 2002; Romanos, 2002; Pinheiro e Moraes, 1984). Neste período, o indivíduo apresenta febre e o sangue torna-se infectante para os vetores não infectados (Monath, 2001).

A resposta à infecção pela febre amarela revela-se ampla e variável. A febre amarela pode ser definida como uma doença infecciosa viral aguda de curta duração cuja gravidade varia, podendo ocorrer sob formas oligossintomáticas, até formas fulminantes, em que os sintomas clássicos de icterícia, albuminúria e hemorragias estão presentes. Mas também causa infecções assintomáticas ou subclínicas que, junto com as formas leves da doença, somente são confirmadas pelos exames laboratoriais específicos (Kerr, 1951; Monath, 2001; Vasconcelos, 2000). O período de incubação médio é de 3 a 6 dias, mas pode ser de até 10 dias (Vasconcelos, 2003).

Após o período de incubação, a infecção rapidamente se dissemina para os rins, linfonodos, baço e medula óssea (<http://www.emedicine.com/emerg/topic645.htm> por Shoff e cols., 2001). Os primeiros sintomas ocorrem de forma abrupta, incluindo febre alta, calafrios, enxaqueca, dores musculares e dorsais, tontura, anorexia, náusea e vômito. O paciente apresenta mal estar com congestão conjuntiva e facial, algumas vezes apresenta sinal de Faget (aumento do ritmo cardíaco com aumento da temperatura), que sugere um envolvimento cardíaco (Smith e Gibson, 1986; Gould e Solomon, 2008).

Geralmente, no 3º ou 4º dia pós-infecção pode haver remissão do quadro, que se caracteriza por ausência de febre e melhora clínica. O caso pode evoluir para cura ou, horas depois do período de remissão, evoluir para a forma grave que se caracteriza por aumento da febre, diarreia e reaparecimento dos vômitos com aspecto escuro. Surgem também icterícia, dor abdominal, e outras manifestações hemorrágicas, tais como: equimoses, gengivorragias e epistaxes. Podem surgir oligúria e outros sinais de insuficiência renal. Podendo haver também comprometimento do sensorio, com obnubilação mental, torpor e, na fase final, evolução para coma (Manual de vigilância epidemiológica da febre amarela, 1999).

Ao exame físico, destacam-se a prostração, sinais de desidratação, dor epigástrica intensa que dificulta a palpação, hepatomegalia moderada, icterícia de grau variável com congestão conjuntival, manifestações hemorrágicas, inicialmente ao nível do tubo digestivo ou da pele, mas que, nos casos mais graves, podem atingir as vias aéreas superiores e até mesmo o ouvido, locais de punção venosa e de injeções intramusculares. Podem ser observadas alterações do ritmo respiratório, soluços e tendência à bradicardia em presença de hipotensão. A convalescença costuma ser rápida e a recuperação completa, mas ocasionalmente pode ser prolongada, acompanhando-se de severa astenia por uma a duas semanas. Muito raramente podem ocorrer óbitos tardios após a convalescença, devidos principalmente à sepse, necrose tubular aguda e pneumonia bacteriana (Manual de vigilância epidemiológica da febre amarela, 1999). Os exames laboratoriais detectam um aumento na concentração de enzimas hepáticas, leucopenia, trombocitopenia e anormalidades na coagulação (Smith e Gibson, 1986; Gould e Solomon, 2008).

O óbito costuma ocorrer após o 6º ou 7º dia do início dos sintomas, raramente após o 10º dia, quando parte dos doentes evolui para a cura espontânea.

Podem ocorrer formas atípicas fulminantes, levando à morte precoce em 24 a 72 horas após o início da doença. O prognóstico é grave, registrando-se alta letalidade, mesmo em regime de terapia intensiva. Esses quadros são raros e geralmente são devidos à coagulação intravascular disseminada (Manual de vigilância epidemiológica da febre amarela, 1999). Aproximadamente 15% dos indivíduos infectados desenvolvem acometimento visceral com icterícia. Dentro desse subconjunto, a taxa de casos que levam a óbito é de 20% a 50%, para todos os casos e casos hospitalizados, respectivamente (Monath, 2007). Até o momento, não existe nenhum tratamento antiviral específico para a infecção pelo vírus da febre amarela (Romanos, 2002), e a vacinação da população em risco é a melhor abordagem para a prevenção e controle da doença (Vasconcelos, 2003).

## **1.5.Prevenção**

### **1.5.1. Vacina**

Antes do advento das vacinas, a febre amarela foi uma das doenças mais temidas pela humanidade, por causa de suas dramáticas manifestações clínicas, alta letalidade, modo de transmissão, o potencial de epidemia e capacidade de se espalhar através das fronteiras e oceanos pelos meios de transporte (Monath, 2012). O agente causador da febre amarela, o vírus da febre amarela, foi isolado pela primeira vez em 1927 em um paciente de Gana chamado Asibi (Rice e cols, 1985).

Na década de 30, Max Theiler e colaboradores produziram uma cepa vacinal através de 176 passagens seriadas em embrião de macaco e em embrião de galinha (Engel e cols, 2006), chamada 17D. Em 1951, Theiler recebeu o Prêmio Nobel por sua pesquisa que salvou muitas vidas (Gardner e Ryman, 2010). A cepa 17D deu origem a duas subcepas distintas, a cepa 17D-204 foi derivada a partir da passagem 204, enquanto a 17DD, desenvolvida por Biomanguinhos, foi derivada independentemente depois da passagem 195 a partir do subcultivo da 17D em ovos embrionados de galinha até a passagem 284 (Engel e cols, 2006).

Na mesma época uma segunda vacina, de vírus vivo atenuado foi desenvolvida uma cepa a partir do vírus da febre amarela isolada no Senegal em 1927 (Smith e Theiler, 1937; Theiler e Smith, 1937; Theiler e Smith, 1937; Gardner e Ryman, 2010). A cepa do vírus selvagem viscerotrópico francês (FVV) passado 128 vezes em cérebro de ratos originou a vacina de vírus neurotrópico francês (FNV). Apesar de a FNV ter provado ser muito eficiente e de acordo com alguns estudos indicarem maior eficácia que a 17D, complicações pós-vacinais foram relatadas em alguns vacinados. Por exemplo, de 43000 indivíduos na Nigéria que receberam a vacina FNV, 83 desenvolveram encefalite pós-vacinal e 32 casos chegaram a óbito. O risco de encefalite pós-vacinal foi tão grande em crianças que a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomendou que a vacina não fosse usada em crianças menores que 14 anos. Essa vacina foi muito usada de 1940 a 1960 nos países africanos de língua francesa, porém perdeu sua popularidade, até seu uso ser descontinuado em 1980 (Barret, 1997).

A vacina 17D é uma das mais efetivas vacinas já produzida. Nos 73 anos decorridos desde seu desenvolvimento, a vacina foi administrada em mais de 540 milhões de pessoas no mundo (Figura 1.6.A) (Monath, 2005; Barrett e Teuwen, 2009). Existem seis produtores da vacina 17D (Brasil, USA, Inglaterra, França, Rússia e Senegal) (Vasconcelos e cols., 2001), que produzem aproximadamente 30-60 milhões de doses por ano. Bio-Manguinhos (Fiocruz) é reconhecido internacionalmente como fabricante da vacina febre amarela (Figura 1.6.B e Figura 1.6.C) (antiamarílica). Desde 1937, as preparações vacinais são obtidas em seus laboratórios, a partir da cepa atenuada 17D do vírus da febre amarela, cultivada em ovos embrionados de galinha livres de agentes patogênicos, de acordo com as normas estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde (portal de Bio-Manguinhos, 2012).

A vacina 17D ainda é produzida em embrião de galinha usando a tecnologia que pouco mudou desde 1945. O resultado da vacinação é uma infecção branda ou subclínica, e uma baixa viremia, que não excede 2 log<sub>10</sub> unidades formadoras de placa (PFU)/mL (Monath, 2007). Embora alguns estudos indiquem que a imunidade persiste em média por 45 anos, a Organização Mundial de Saúde indica a revacinação a cada 10 anos para a manutenção da imunidade (Barret e Teuwen, 2009).



A



B



C

**Figura 1.6.** Vacina para o vírus da febre amarela 17DD. **A)** Profissionais de saúde administrando a vacina da febre amarela em um bebê em uma estrada em Abidjan, Costa do Marfim, depois que um caso de febre amarela foi descoberto. Extraída de [www.voanews.com/content/high-yellow-fever-risk-prompts-mass-vaccination-in-sierra-leone-78177\\_112/416048.html](http://www.voanews.com/content/high-yellow-fever-risk-prompts-mass-vaccination-in-sierra-leone-78177_112/416048.html). **B)** Vacina de febre amarela 17DD produzida no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos da Fiocruz (Bio-Manguinhos – Fiocruz). Extraída de [www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/vacinas/febre-amarela](http://www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/vacinas/febre-amarela). **C)** Produção da vacina contra a febre amarela no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos da Fiocruz (Bio-Manguinhos – Fiocruz). Extraída de [www.fiocruz.br/ccs/cqi/cqilua.exe/sys/start.htm?from\\_info\\_index=21&infoid=1900&sid=9&tpl=printerview](http://www.fiocruz.br/ccs/cqi/cqilua.exe/sys/start.htm?from_info_index=21&infoid=1900&sid=9&tpl=printerview).

Essa vacina, produzida no Brasil desde 1937, primeiramente pelo Instituto Oswaldo Cruz e, posteriormente, pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, é constituída por vírus atenuados derivados de uma amostra africana do vírus amarelíco selvagem, denominada *Asibi*. A linhagem 17D é cultivada em ovos embrionados de galinha (Guia de vigilância epidemiológica, 2005).

O vírus da febre amarela pode ser inativado por solventes lipídicos (éter, clorofórmio) e/ou aquecido a 56°C por 30 minutos sob luz ultravioleta. A vacina 17D é efetiva contra todos os genótipos de vírus da febre amarela, nos dois continentes (World Health Organization). O vírus da vacina 17D difere de seu progenitor selvagem em 31 mutações, o que representa uma mudança próxima de 0,8%. A

base molecular que precisa a atenuação não é completamente conhecida, mas é, sem dúvida, multigênica. Existem sete fabricantes da vacina em todo o mundo, mas somente três, Brasil, França e Senegal, produzem quantidades suficientes para serem utilizadas no Programa de Imunização Estendido (*Expanded Program Immunization* – EPI) ou em vacinações de emergência (Monath, 2008).

A vacina apresenta-se sob a forma liofilizada em frasco-ampola de 50, 10 e 5 doses, acompanhada de diluente. Cada frasco-ampola deve trazer o número do lote e a validade. A produção da vacina permitiu pela primeira vez o seu uso em maior escala durante o surto epidêmico de febre amarela ocorrido no município de Varginha (MG). Posteriormente, foi utilizada em programas de vacinação em outros estados brasileiros, com grande sucesso (Vigilância epidemiológica, 1999).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a vacinação a todas as crianças maiores de seis meses, que vivam em áreas endêmicas, ou que se dirijam a elas (Vasconcelos, 2003). Esta vacina confere proteção entre o sétimo e décimo dia após a aplicação, período no qual aparecem os anticorpos protetores e razão pela qual a imunização deve ocorrer dez dias antes de se ingressar em área de transmissão. A vacina confere imunidade por, aproximadamente, 10 anos, podendo, em alguns casos, uma única dose proteger por mais de três décadas (Guia de vigilância epidemiológica, 2005; Santos-Torres, 2000). Estudos realizados mostram que 97,1% das pessoas vacinadas têm anticorpos protetores contra o vírus após 18 anos (Vigilância epidemiológica, 1999; Guerra e cols. 1997).

A base molecular da atenuação da virulência do vírus da Febre Amarela é desconhecida. A cepa vacinal febre amarela 17D e a cepa selvagem Asibi diferem entre si em apenas 68 nucleotídeos em mais de 10.860 nucleotídeos (~0,63%), que resulta em 32 aminoácidos diferentes. O gene codificante da proteína E é o que sofre maior mutação de todo o genoma, com 11 nucleotídeos e 8 aminoácidos de diferença (Hahn, 1987). Como a proteína E desenvolve um papel essencial na entrada do vírus na célula, algumas dessas mutações devem alterar o tropismo do vírus e assim afetar sua virulência. Curiosamente, a passagem do FA-17D em tecido neural pode converter em um vírus neurovirulento devido as mutações na proteína E. Além das mutações no gene que codifica a proteína E, mutações na região não traduzida 3' (3'UTR) são prováveis participantes do processo de atenuação (Ryman e cols., 1997; Guirakhoo e cols., 2004; Monath e cols., 2002; Schlesinger e cols., 1996; Pulendran, 2009).



No Brasil, as vacinas presentes no calendário de vacinação estão disponíveis gratuitamente nas unidades de atendimento da rede pública de saúde. O sistema de vigilância epidemiológica do Ministério da Saúde coleta e analisa os dados relacionados a doenças infecciosas. A vigilância de eventos adversos após a imunização (AEFI) é realizada pelo Programa Nacional de Imunização (PNI). O Sistema de Vigilância Nacional do AEFI processa os dados gerados a partir de uma forma padronizada de vacinação de times e profissionais da saúde (Fernandes e cols, 2007).

### **1.5.2. Efeitos Adversos**

O vírus da febre amarela selvagem é normalmente viscerotrópico, diferente do vírus vacinal. Porém nos últimos anos, casos de eventos adversos graves associados com a vacina de febre amarela foram registrados. Esses registros mostram que os sintomas clínicos e os sinais apresentados pela vacina de febre amarela podem não ser distintos da infecção natural com o vírus selvagem (Chan e cols. 2001; Martin e cols., 2001 e Vasconcelos e cols. 2001).

Eventos adversos comuns são brandos e ocorrem de 5-7 dias após a vacinação. A revacinação é ainda mais segura em relação a eventos associados à viremia (Monath, 2004; Brasil Ministério da Saúde FUNASA; CDC 2001; Camacho e cols., 2005; Fernandes e cols., 2007). A neurovirulência do vírus vacinal tem sido demonstrada em modelos animais e nos registros de encefalites, principalmente em crianças. A incidência de encefalites após a vacinação foi estimada em 0.5-4.0/1000 em crianças menores de 6 meses (Monath, 2004; CDC 2001; Fernandes e cols., 2007), e em 1/1000000 ou menos em adultos (Monath, 2004; Fitzner e cols., 2004; Fernandes e cols, 2007).

A vacina 17D é considerada segura com alguns raros casos de reações adversas severas (SAEs) após a imunização. Isso se torna bem tolerado, com registros de dor na região da aplicação da vacina, inflamação, dores de cabeça, mialgia, febre baixa e outros sintomas leves que ocorrem de 2 a 30 dias após a vacinação. Dois tipos de reações adversas severas têm sido registrados: a primeira,

doença neurotrópica associada à vacina (YEL-AND) e a segunda, a doença viscerotrópica associada a vacina (YEL-AVD) (Barrett e Teuwen, 2009; Barret e cols., 2007; Ferguson e cols., 2010; Stock e cols, 2012).

A doença neurotrópica associada à vacina (YEL-AND) causada pela neuroinvasão do vírus 17D pode incluir encefalite pós-vacinal, síndrome Guillain-Barré e doenças autoimunes com envolvimento do sistema nervoso central ou periférico (Ryman e cols., 1997; Guirakhoo e cols., 2004; Monath e cols., 2002; Schlesinger e cols., 1996; Pulendran, 2009). Encefalites pós-vacinal são caracterizadas no início dos sintomas, 7-21 dias após a vacinação, com febre e variação de sinais neurológicos (incluindo meningismo, convulsão, obnubilação e paresia) associados à alteração cerebral e testes de fluido espinhal (100-500 células e aumento da concentração protéica). A evolução do quadro clínico é tipicamente breve e a recuperação é geralmente completa. Embora a função cerebral anormal seja a característica mais importante para a distinção entre a encefalite e meningite, essa distinção é normalmente difusa, pois alguns pacientes podem apresentar ambos os processos (parenquimal e meníngeo) com características clínicas de ambos (Fernandes e cols., 2007).

A doença viscerotrópica associada à vacina (YEL-AVD) é uma infecção pansistêmica iniciada com acometimento hepático, uma condição muito similar à infecção selvagem pelo vírus da febre amarela (Hayes, 2007; Barret e Teuwen, 2009). De 2-5 dias após a vacinação, o paciente desenvolve febre alta, indisposição e mialgia, seguido de icterícia, oligúria, instabilidade cardiovascular, hemorragia, falha renal e respiratória. A taxa de mortalidade é superior a 50% e altos títulos do antígeno do vírus da febre amarela podem ser encontrados no fígado, coração e outros órgãos, principalmente em tecidos associados a macrófagos (Khromava e cols., 2005; Galler e cols., 2001; Bae e cols., 2008; Pulendran e cols., 2008; Belsher e cols., 2007).

Os mecanismos subjacentes a esses eventos permanecem desconhecidos, mas a rapidez que aparecem os primeiros sintomas da doença sugerem um possível papel da resposta imune inata. Mutações genéticas no vírus FA-17D aparentemente não são a causa, pois os isolados do vírus FA-17D de pacientes com eventos adversos graves possuem as mesmas sequências de nucleotídeos da cepa vacinal original. O maior obstáculo para estudos sobre esses mecanismos é a raridade dos

casos e amostras (Galler e cols., 2001). As razões para a ocorrência de eventos adversos graves, assim como o mecanismo de atenuação da vacina e sua interação com o sistema imune, ainda são pouco entendidos. Entretanto, a relação entre benefício e risco da vacinação é favorável em áreas endêmicas de febre amarela (Ferguson e cols., 2010).

Existem diversas precauções e contra indicações para o uso da vacina. (Barret e Teuwen, 2009). Indivíduos acima de 60 anos aparentemente tem o risco relativo alto de adquirir YEL-AVD quando comparado a população mais jovem. Aparentemente, um problema genético na resposta do sistema imune, possivelmente nos alelos que sintetizam 2,5-oligoadenilato, poderia explicar essa patogênese (Monath, 2007).

A vacina de febre amarela é contra indicada para pessoas com histórico de hipersensibilidade para qualquer componente da vacina, incluindo ovos, produtos derivados de ovos, proteínas derivadas de galinhas ou gelatina. A tampa usada nos frascos da vacina também contém borracha e látex, o que pode causar uma reação alérgica. De acordo com o fabricante, pessoas que são aptas a ingerir ovos ou derivados de ovos podem receber a vacina. Entretanto, reações de hipersensibilidade podem ocorrer em pessoas com histórico de reações menores de sensibilidade a ovos (Sanofi Pasteur, 2010).

Existe também contra indicação para crianças menores de seis meses de idade. Essa contra indicação foi instituída no final da década de 60 em resposta a alta taxa de YEL-AND documentada em crianças com menos de 6 meses de idade. O mecanismo de aumento da neurovirulência em crianças é desconhecido, mas pode ser atribuído à imaturidade da barreira hemato-encefálica maior ou mais prolongada viremia ou imaturidade do sistema imune (Public Health Service, 1969).

Também não é indicado que indivíduos com alteração no sistema imune recebam a vacina. Pessoas com distúrbios no timo associados a funções anormais de células imunes (por exemplo, timoma e miastenia grave), imunossupressão severa por infecção pelo vírus HIV, terapias imunossupressivas ou imunomodulatórias e imunodeficiências em geral (Staples e cols, 2010).

## 1.6. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico clínico da febre amarela e a identificação dos eventos adversos associados à vacina de febre amarela (FA-VAE) são particularmente difíceis devido a similaridade dos sintomas com um amplo número de doenças, como a febre do dengue, leptospirose, malária e outras doenças hemorrágicas virais, portanto a confirmação por um exame laboratorial é essencial. Como critério para o diagnóstico laboratorial, a Organização Mundial de Saúde recomenda a detecção de anticorpos IgM específicos para febre amarela ou o aumento de quatro vezes ou mais no nível sérico de IgG na ausência de recente vacinação para a febre amarela e diagnóstico negativo para outras flavivirose (WHO 2003). A presença da infecção amarílica pode ser confirmada através do isolamento do vírus, histopatologia do tecido hepático *post-mortem* positiva, detecção do antígeno de febre amarela em tecidos por imunohistoquímica ou a detecção do RNA genômico no sangue ou órgãos por RT-PCR ou qRT-PCR (WHO, 2003; Domingo e cols, 2012).

O isolamento é realizado através da inoculação do material do paciente e/ou animal (sangue e derivados ou tecidos) em culturas celulares que são muito utilizadas por apresentarem boa sensibilidade. Após 3 a 5 dias da inoculação, o vírus causa efeito citopatogênico caracterizado por alterações morfológicas das células. Atualmente, as células mais usadas no diagnóstico são células de mosquitos como *Aedes albopictus*, clone C6/36 (Igarashi, 1978). Utiliza-se também o *Aedes pseudoscutellaris* AP61. É um método relativamente rápido, sensível e econômico. Também são usadas células de vertebrados como a VERO (rim de macaco verde africano); a BHK-21 (rim de hamster recém-nascido) e LLC-MK2 (rim de macaco Rhesus) (Manual de vigilância epidemiológica da febre amarela, 1999).

Após a fase de viremia, o uso de métodos sorológicos representa uma boa opção para confirmar a infecção pelo vírus da febre amarela, mas geralmente duas amostras são requeridas com intervalo de duas semanas. O diagnóstico sorológico comumente incluem testes de ELISA, inibição da hemaglutinação e ensaio de soroneutralização, mas reações cruzadas entre os flavivírus constituem o maior obstáculo na realização do diagnóstico sorológico principalmente em áreas endêmicas, onde circulam outros flavivírus (dengue, encefalite de St. Louis ou vírus

do Oeste do Nilo). Soroneutralização é considerada a técnica sorológica mais específica, entretanto, os ensaios são trabalhosos e demorados e estão disponíveis somente em laboratórios especializados. No entanto, a disponibilidade de ensaios comerciais para o diagnóstico sorológico de febre amarela aumentou a implementação de tais técnicas. Os ensaios comerciais são, em geral, bem padronizados e oferecem bons padrões de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade nos laboratórios de diagnóstico para poder receber a autorização para diagnóstico *in vitro*. Os métodos moleculares para a detecção do genoma viral é uma alternativa rápida, sensível e altamente específica para o diagnóstico sorológico durante a fase de viremia, permitindo identificação precoce da infecção e podendo ser aplicado em tecidos *post-mortem* (WHO, 2003; Domingo e cols, 2012).

#### **1.6.1. Reação de Transcrição Reversa acoplada à Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)**

Um dos mais importantes procedimentos em virologia é a quantificação do título viral em uma amostra clínica. Uma metodologia amplamente usada para determinar a concentração de partículas virais infecciosas é a titulação viral por contagem de placa de lise. Esta metodologia foi primeiramente desenvolvida para calcular o título de estoque de bacteriófagos. (Dulbecco e Vogt,1953). Para a quantificação da carga de partículas infecciosas tanto em cultura celular quanto em amostras de soro, o ensaio de placa de lise ainda é o método usado habitualmente. Entretanto essa técnica consome muito tempo, no mínimo 5 dias (Bae e cols., 2003). A quantificação viral tradicionalmente tem sido feita pelo ensaio de placa de lise, mas o RT-PCR quantitativo (RT-qPCR) tem tido preferência pela sua simplicidade, rapidez e sensibilidade (Mackay, Arden e Nitsche, 2002; Dash e cols, 2012).

A reação em cadeia da polimerase quantitativa por transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR) é baseada no revolucionário método de PCR, desenvolvido por Kary Mullis na década de 80, que permite amplificar partes específicas de DNA e RNA. Estratégias baseadas na PCR impulsionaram o avanço da biologia molecular permitindo aos pesquisadores a manipulação do DNA, assim facilitando

procedimentos comuns como a clonagem, e grandes empreendimentos, como o Projeto Genoma Humano. A PCR em tempo real representa ainda outro salto tecnológico, que abriu novas e potentes aplicações para pesquisadores em todo o mundo, em parte devido à enorme sensibilidade da PCR associada à precisão proporcionada pelo monitoramento em tempo real dos produtos gerados na reação (Valasek e Repa, 2005). Esta metodologia foi desenvolvida com o objetivo de automatizar a detecção de produtos pós-PCR tornando a reação mais eficiente, rápida e segura (evitando contaminação das amostras com amplicons), empregando-se o ácido nucléico alvo (DNA ou RNA) extraído de tecidos, fluidos de pacientes ou de cultura de células infectadas (Manojkumar e Mrudula, 2006).

O método consiste na utilização de um par de oligonucleotídeos sintéticos, chamados de iniciadores (primers), que hibridiza com cada fita do DNA alvo fita dupla (dsDNA), delimitando assim a região que vai ser amplificada. O primer hibridizado serve como substrato para a DNA polimerase (enzima normalmente derivada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*, chamada de *Taq*), que sintetiza uma fita complementar através da adição sequencial de desoxinucleotídeos (Mackay, Arden e Nitsche, 2002).

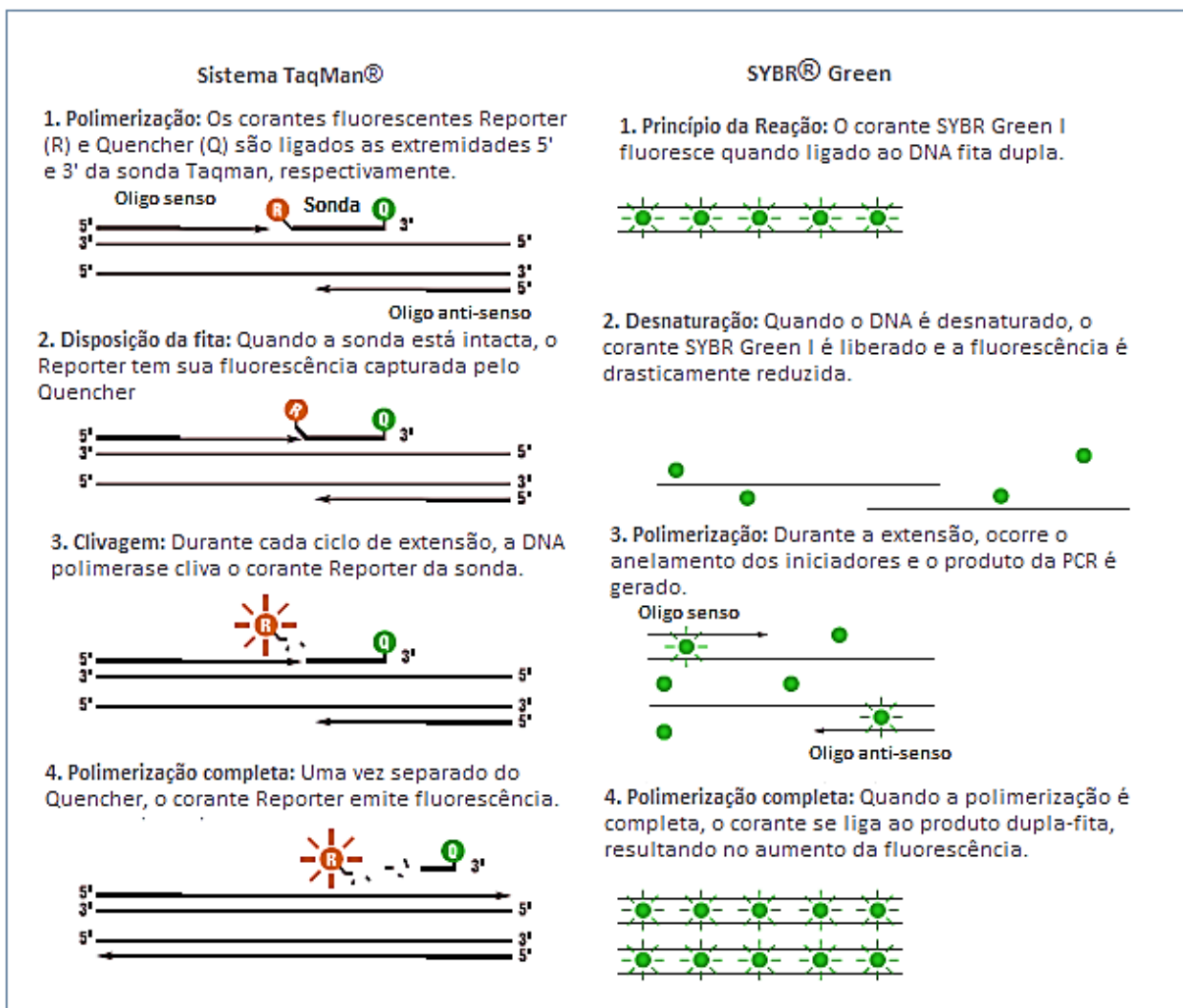
A RT-PCR em tempo real pode ser realizada em uma reação de uma única etapa, onde toda a reação, desde a síntese do cDNA até a amplificação por PCR ocorre em um único tubo, ou em uma reação de duas etapas, onde a transcrição reversa e a amplificação por PCR ocorrem em reações distintas. Acreditava-se que uma reação única minimizaria a variação experimental devido a ambas as reações enzimáticas ocorrerem em um único tubo, porém como o RNA é muito instável e degrada muito rápido, na verdade necessita uma manipulação mais cuidadosa e veloz para evitar o comprometimento do experimento. Além disso, os protocolos de única etapa se mostraram com menor sensibilidade em relação ao de duas etapas, apesar deste último ter maior chance de contaminação (Wong e Medrano, 2005).

Todo o sistema de amplificação em tempo real depende da detecção e quantificação de uma molécula que reporta a fluorescência, onde o aumento do sinal é proporcional à quantidade de produto gerado. Esse método simples envolve a incorporação de um corante fluorescente que se liga ao DNA (Figura 1.7), como o SYBR® Green. Esse corante se liga a qualquer DNA dupla fita na reação, à medida que este vai sendo amplificado. Na amplificação em tempo real, o aumento do sinal

fluorescente pode ser observado durante a etapa de polimerização do DNA e diminui durante a etapa de desnaturação. Assumindo que a reação foi bem projetada e otimizada, a detecção por SYBR® Green ocorre muito bem, com um aumento no *background* de fluorescência, tipicamente observado durante os últimos ciclos da reação (Niesters, 2001). Entretanto, como o SYBR® Green se liga a todo DNA fita dupla sintetizado durante a reação, incluindo dímeros dos iniciadores e outros produtos inespecíficos, pode-se superestimar a concentração do fragmento alvo (Novais e Pires-Alves, 2004).

A reação pelo sistema TaqMan® (Figura 1.7) requer a hibridização de uma sonda interna à seqüência alvo que será amplificada, marcada com dois corantes fluorescentes, um corante que emite fluorescência (*reporter*) e um corante capturador de fluorescência (*quencher*). Quando a sonda está intacta (não-hibridizada ao alvo), a transferência de fluorescência ocorre, fazendo com que a fluorescência emitida pelo corante *reporter* seja absorvida pelo *quencher*. Durante a fase de extensão pela DNA polimerase, a sonda hibridizada é clivada pela atividade nucleolítica 5'-3' da DNA polimerase. Com a clivagem da sonda, a emissão de fluorescência do *reporter* não é mais absorvida eficientemente pelo *quencher*, resultando no aumento do espectro de fluorescência do *reporter* (Heid e cols., 1996).

Usualmente, para a maior eficiência dos ensaios de qPCR em tempo real, busca-se o desenho de oligonucleotídeos que gerem pequenos amplicons (em torno de 150 pb), permitindo assim um tempo menor de reação (cerca de 15 segundos) e também fazendo com que os oligonucleotídeos e sondas possam competir com maior eficiência para o anelamento com suas respectivas seqüências complementares. Para determinar a combinação de oligonucleotídeos e sondas TaqMan para um determinado alvo genômico, são usados *softwares* específicos, nos quais, os parâmetros configurados assemelham-se às condições encontradas nas ampliações experimentais (Niesters, 2001).



**Figura.1.7.** Comparação entre os sistemas TaqMan® e SYBR® Green. Extraído e adaptado de [http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/\\_applications-technologies/real-time-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html](http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/_applications-technologies/real-time-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html)

A rapidez da RT-qPCR é devida principalmente à remoção de procedimentos posteriores como por exemplo a necessidade de gel de agarose, para a detecção dos produtos amplificados e comparado ao PCR convencional, esse processo apresenta várias vantagens: resultados mais rápidos, com menos etapas, logo, menor chance de contaminação e a capacidade de monitorar o produto da PCR dentro do próprio tubo da reação (sistema fechado); o uso de múltiplos fluoróforos associados a diferentes sondas TaqMan, os quais apresentam comprimentos de ondas diferentes, tornando possível a detecção de mais de um alvo molecular em uma mesma reação; e, por último, a maior vantagem é a possibilidade de quantificação absoluta, uma vez que a fluorescência gerada em um determinado Ct permite estimar a concentração inicial do ácido nucléico alvo presente na amostra que se quer quantificar (Mackay , Arden e Nitsche , 2002).



Para a manutenção da alta qualidade de um resultado de diagnóstico laboratorial, é necessária a padronização destes métodos. O diagnóstico laboratorial deve ter acurácia e rapidez, com uma boa relação custo benefício. O desafio atual no estudo de doenças humanas virais incluem a aplicação de técnicas avançadas para evitar reações cruzadas entre amostras de origens diferentes, cepas e sorotipos, assim como o desenvolvimento de diretrizes de padronização internacionais para a implementação de garantia de qualidade nesses testes laboratoriais (Manojkumar e Mrudula, 2006).

### **1.7. Validação**

Os princípios de verificação e validação existem para garantir os padrões de práticas de laboratório e precisão dos resultados de ensaios realizados por laboratórios clínicos (Burd, 2010). A necessidade de garantir a qualidade de métodos laboratoriais, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Para registro de novos produtos e emissão de laudos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação (Ribani e cols., 2004).

As especificações de desempenho para testes de laboratório desenvolvidos devem ser estabelecidas para as seguintes características: exatidão, precisão, sensibilidade analítica, especificidade analítica, devendo incluir substâncias interferentes, faixa declarável, intervalos de referência (valores normais), e quaisquer outras características necessárias para a realização do teste (Burd, 2010).

A especificidade está relacionada ao evento da detecção do alvo. A especificidade refere-se a um método específico para um único analito (Silva e Alves, 2006). A especificidade de um método de quantificação é a capacidade de

avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A especificidade avalia o grau de interferência de espécies como outros vírus, impurezas e produtos celulares, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A especificidade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do material, no caso, o vírus de interesse. Se a especificidade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (Ribani e cols., 2004).

A precisão refere-se à forma como uma determinada medição pode ser reproduzida, quando um teste é aplicado repetidamente a alíquotas múltiplas de uma única amostra homogênea (Burd, 2010), onde as formas mais comuns de expressá-la são por meio de repetitividade e reprodutibilidade expressas pelo desvio padrão. A precisão intermediária é a precisão intercorridas, ou seja, refere-se à concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com operadores e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes. (Silva e Alves, 2006). Precisão (também referido como erro analítico aleatório) está relacionada inteiramente ao erro aleatório causado por fatores que podem variar durante o funcionamento normal do ensaio (Burd, 2010).

Repetibilidade e reprodutibilidade são usadas para medidas extremas de precisão, sendo a repetibilidade (ou imprecisão intra-ensaio), sendo a menor medida da precisão e envolvendo medições realizadas no âmbito de mesmas condições (mesmo operador, lotes de reagentes, instrumento, laboratório, tempo) e reprodutibilidade (imprecisão entre ensaios, imprecisão no mesmo dia), sendo a maior medida de precisão e envolvendo os resultados de medições sob condições alteradas (operadores diferentes, lotes de reagentes, laboratório, tempo). Todas as outras medidas de precisão são consideradas como medidas intermediárias, e as condições devem ser explicitamente especificadas (Burd, 2010). Frequentemente, altas variações são observadas entre os resultados. Estudos colaborativos (em rede) não são somente indispensáveis para avaliação da reprodutibilidade, mas também podem ser de grande ajuda para testar a exatidão do método (Ribani e cols., 2004).

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e o valor de referência aceito como

verdadeiro (Instituto Nacional de Metrologia, 2003). É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza. A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Estes limites podem ser estreitos em níveis elevados de concentração de ácidos nucleicos de uma determinada amostra e mais amplos em níveis quando a amostra apresenta escassez de ácidos nucleicos alvo de detecção (Ribani e cols., 2004).

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (Ribani e cols., 2004). O limite de detecção deve ser determinado para ambos os testes quantitativos e qualitativos. O limite de detecção é expresso em medida de concentração (geralmente cópias / mL; cópias / g DNA para os ensaios moleculares), de tal modo que quanto mais baixa a concentração detectável de analito, maior a sensibilidade analítica do ensaio. A eficiência do método no limite de baixa concentração é muitas vezes de grande interesse em testes moleculares para doenças infecciosas porque define a capacidade do teste para o diagnóstico da doença e determina os parâmetros para o tratamento (Burd, 2010).

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida (quantificada), utilizando um determinado procedimento experimental (Ribani e cols., 2004), estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis (Silva e Alves, 2006). Na maioria das vezes, no entanto, o limite de detecção reside abaixo do intervalo linear de um ensaio e é menor que o limite de quantificação. O limite de detecção não pode ser superior ao limite de quantificação (Burd, 2010).

De acordo com o INMETRO, a robustez de um método (*robustness*) mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações (Instituto Nacional de Metrologia, 2003). Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros (Ribani e cols., 2004).

Em ensaios em que a inibição da reação é uma fonte significativa de resultados falso-negativos, é necessário o uso de indicadores de inibição. A inibição

em ensaios moleculares pode resultar de alterações no pH, concentração iônica, a viscosidade ou inibição direta da enzima polimerase por agentes presentes nas amostras em análise. Os inibidores de amplificação podem ser detectados usando um controle interno. O raciocínio é que, se uma amostra não permitir a amplificação de um controle interno, a amplificação de uma sequência alvo pretendida pode também ser inibida. Controles internos não podem diferenciar entre inibição e uma falha na amplificação devido a uma série de variáveis, tais como falha do termociclador, falha na adição de enzimas ou outros reagentes. Vários controles internos são usados em ensaios moleculares. Os controles internos podem ser homólogos extrínsecos, heterólogos extrínsecos, ou heterólogos intrínsecos. Para evitar competição e evitar reduções na sensibilidade, os controles internos devem ser usados na menor concentração que permite a detecção coerente do controle (Burd, 2010). A presença de compostos inibidores e a extensão da inibição também podem ser determinadas por PCR convencional semi-quantitativo, adicionando um molde de nucleico diferente do alvo a ser investigado, diretamente na amostra, antes da extração, ou introduzidos na mistura da reação (Shulman e cols. 2012).

## **2. Justificativa**

O desenvolvimento e a produção de vacinas virais, de uma forma geral, envolvem diversas etapas que precisam ter a carga viral monitorada ao longo de todo o processo. Essas etapas vão desde a produção do antígeno, purificação, inativação, liofilização, testes pré-clínicos e clínicos e uma vez o produto licenciado, um processo de fármaco-vigilância contínuo se faz necessário. Atualmente em Bio-Manguinhos, essas etapas são monitoradas pelo ensaio de titulação em placa de lise que leva em torno de sete a dez dias. Com o desenvolvimento do RT-PCR em tempo real, temos disponível uma abordagem mais rápida para este monitoramento, que pode ser feito em poucas horas. Dentro deste contexto, o desenvolvimento, padronização e validação de uma técnica que permita quantificar o vírus da febre amarela vacinal de forma rápida e eficaz, em todas as etapas acima descritas, é de extrema importância para a otimização deste processo.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Padronizar e validar a técnica de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) para estabelecer o número de cópias virais do vírus da febre amarela vacinal em amostras.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Testar diferentes pares de iniciadores para regiões do genoma de vírus de febre amarela;
- Estabelecer uma correlação entre PFU/mL e a quantidade (cópias) de RNA/mL de vírus de febre amarela;
- Acompanhar a cinética de replicação do vírus da febre amarela *in vitro* através da PCR em tempo real e do ensaio de placa de lise;
- Obtenção de um plasmídeo contendo cDNA viral para estabelecimento do número de cópias padrão viral;
- Otimizar a concentração do conjunto de oligonucleotídeos e sonda para o ensaio de PCR em tempo real;
- Validar o teste em relação a linearidade, especificidade e precisão intermediária com o uso de amostras de soro rescontituído e em amostras de pacientes vacinados;
- Determinar e padronizar controles internos.

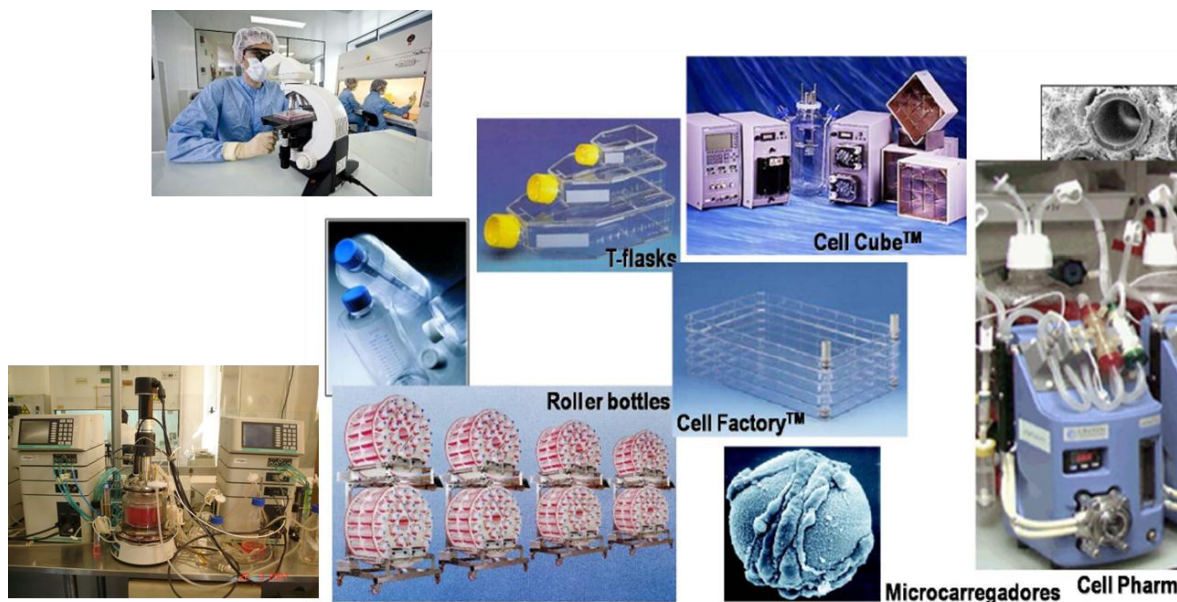
## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Amostras

Nos experimentos da validação, foram usadas dois tipos de amostras. Para a construção do painel sorológico, o vírus purificado foi reconstituído em soro humano negativo (Negative Quality Control Serum, NIBSC), em três concentrações virais: **alta** com carga viral de  $10^4$  cópias/reação, **média** com  $10^3$  cópias/reação e **baixa** com  $10^2$  cópias/reação do vírus de febre amarela, adicionadas à soro humano de indivíduo saudável. Essas amostras foram aplicadas em oito réplicas cada. Também foi avaliado um *pool* de amostras clínicas (diversas amostras de soro humano de pacientes vacinados) em três concentrações do vírus da febre amarela, **alta** com carga viral de  $10^3$  cópias/reação, média com  $10^2$  cópias/reação e **baixa** com 50 cópias/reação. As amostras clínicas foram aplicadas em 10 réplicas. Os experimentos foram autorizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas IPEC/FIOCRUZ através do parecer 058/2008.

Nos experimentos de acompanhamento da cinética viral *in vivo* e *in vitro*, por ensaio de placa de lise e RT-qPCR, foram usadas amostras de soro de 4 primatas não humanos, macaco Rhesus (*Macaca mulata*) cedidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). O experimento foi autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ através da licença LW-22/12 com validade até 12/04/2016. Os animais foram imunizados por via subcutânea com a vacina 17DD produzida em Bio-Manguinhos. As amostras foram coletadas com o intervalo de 2, 4, 6, 8 e 10 dias após a infecção.

Também utilizamos amostras de cinéticas em garrafas estacionárias, em biorreatores e em *cell factories* (Figura 4.1). Para a cinética de biorreatores, foram analisadas amostras do dia da coleta (referente ao 4º dia após a inoculação), de quatro lotes diferentes. Na curva de propagação viral em garrafa estacionária, alíquotas foram retiradas de hora em hora nas primeiras 6 horas e posteriormente de 24 em 24 horas, durante 7 dias. Para a curva de propagação viral em *cell factory*, foram analisadas amostras de duas cinéticas durante 7 dias.



**Figura 4.1.** Sistemas de produção de antígenos virais. Extraído e adaptado de <http://www.isaude.net/pt-BR/noticia/4973/ciencia-e-tecnologia/mutacao-genetica-simples-e-capaz-de-provocar-cancer-endometrial>

#### 4.2. A Célula Vero

Células Vero, correspondem à uma linhagem de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) adulto (ATCC, CCL 81). Trata-se de uma linhagem aceita para a produção e padronização de vacinas e vem sendo muito utilizada na propagação de *flavivirus*.

A partir de banco de células armazenado a  $-196^{\circ}\text{C}$ , células Vero foram expandidas e mantidas em meio 199 com sais de Earle (10X) (Sigma®), tamponado com bicarbonato de sódio gaseificado 4,4%, pH 7,0, suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado (Cultilab) e antibiótico 1% (Sulfato de gentamicina 4 mg/mL) com incubação sem agitação em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ .

Sua manutenção foi realizada com passagens semanais e a confecção das placas e lâminas a serem utilizados nos diferentes experimentos foi sempre realizada com 24 horas de antecedência. Para tal, as monocamadas celulares foram tratadas com uma solução de tripsina/EDTA a 1% em PBS por 5 minutos em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ . Uma vez dissociadas da monocamada, as células foram ressuspensas em 5mL de meio completo (10% Earle 199, 5% de  $\text{NaHCO}_3$ , 5% soro fetal bovino, 1%



sulfato de gentamicina) e sua quantidade estimada por contagem de uma alíquota em câmara de Neubauer para a confecção de placas e lâminas nas densidades celulares desejadas.

### **4.3. Propagação viral**

A partir da vacina liofilizada do vírus vacinal 17DD recebido de Bio-Manguinhos (Fiocruz) na forma liofilizada, foi obtido o vírus 17DD usado em todos os experimentos. Para tal, um frasco de 17DD liofilizado foi reconstituído em água bidestilada estéril e homogeneizado em agitador. A suspensão viral acrescida de 3 mL de meio completo foi utilizada na infecção de uma garrafa contendo uma monocamada de células Vero na concentração de 60.000 células/cm<sup>2</sup> para propagação viral. O M.O.I. (Multiplicidade de Infecção) usado foi de 0,002. O sobrenadante da garrafa foi descartado e 2,0 mL do inóculo viral foi adicionado e incubado por 1 hora sem agitação a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A infecção foi monitorada até a visualização de intenso efeito citopático (CPE) quando foi coletado o sobrenadante da cultura contendo o vírus adicionado ao estabilizador sorbitol 8%, a seguir, aliquotado e armazenado a -80 °C.

### **4.4. Curva de propagação viral em garrafa estacionária**

Concomitantemente com a propagação viral, foi realizada uma cinética de proliferação viral através da infecção de monocamadas de células Vero com MOI de 0,02 em um experimento independente. Para tal, as células foram semeadas em garrafas T-175cm<sup>2</sup> com densidade de 60.000 células/cm<sup>2</sup> e a infecção, realizada 24 horas depois. Amostras de 1,0 mL do sobrenadante das culturas celulares foram coletadas em intervalos de 1 hora nas primeiras 6 horas, e com intervalos de 24 horas após a infecção e estocadas a -80 °C. Os títulos virais de cada alíquota foram estimados por titulação em placa de 6 poços e por RT-qPCR.

#### **4.5. Purificação do Vírus**

O sobrenadante viral produzido em biorreatores utilizando células Vero aderidas à microcarregadores foi decantado e clarificado utilizando três filtros em série: (1) Sartopure PP2 Mini Caps (8,0 µm), (2) Sartoclean CA (3,0 + 0,8 µm) e (3) Sartobran P (0,45 µm + 0,2 µm). Todas as unidades filtrantes citadas são da marca Sartorius-Stedim.

O sobrenadante clarificado foi submetido a uma primeira etapa de purificação (etapa de captura, utilizando membrana de troca iônica), com o objetivo de concentrar e estabilizar o antígeno de interesse, eliminando a maior parte dos contaminantes. A purificação do vírus foi realizada por cromatografia em membrana SARTOBIND Q, utilizando o sistema Äkta Purifier 10, operado pelo software UNICORN (GE Helthcare). A vazão de trabalho foi de 10 mL/min, em acordo com as recomendações do fabricante. A sanitização foi realizada com 50mL de NaOH 1M e o equilíbrio com igual volume de Hepes 50mM, pH 8,5. Para detecção utilizou-se o comprimento de onda de 280nm. O pH da suspensão viral clarificada foi ajustado para 8,5 com NaOH 1M antes de sua aplicação na membrana. O volume aplicado foi de 200mL. Substâncias não ligadas foram lavadas com 30mL de solução de equilíbrio. Em seguida, aplicou-se o tampão de eluição (Hepes 50mM – 0,25M NaCl) e as frações coletadas analisadas para quantificação do vírus. Nova sanitização foi realizada com 50mL de NaOH e após re-equilíbrio, as membranas foram rinsadas com etanol 20% contendo KCl 1M e estocadas a 4 °C.

#### **4.6. Titulação dos Vírus da FA 17DD por Contagem de Placas de Lise em Meio Semi-Sólido**

A dosagem dos títulos virais foi realizada pela contagem do número de placas de lise produzidas em monocamadas de células Vero, sob meio Earle 199/CMC. Foram usadas placas de 6 orifícios, com células Vero inoculadas à densidade de 60.000 células/cm<sup>2</sup>, 24 horas antes do uso. A titulação das amostras virais foi realizada a partir da infecção de monocamada de células Vero. Inicialmente foi realizada a diluição seriada de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup> de cada amostra viral, seguindo-se a

inoculação de 100 µL das diferentes diluições em placa de 24 poços. Após o inóculo, as placas foram incubadas a 37° C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para a adsorção viral (por 1 hora), sendo homogeneizadas a cada 15 minutos. Decorrida uma hora de incubação, o excesso de vírus de cada poço foi aspirado, sendo substituído por 1,0 mL de carboximetilcelulose 3% (CMC) (Sigma®) com meio Earle 199 acrescido de 5% NaHCO<sub>3</sub>, 5% de soro fetal bovino e 1% de gamicina. Foi realizada então a incubação em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade relativa por 7 dias. Uma vez concluída a incubação, as placas foram fixadas pela adição de uma solução de formaldeído a 10% por pelo menos uma hora, lavadas exaustivamente em água corrente e coradas com solução de cristal violeta a 0,02% por 30 minutos.

Após secagem, as placas de lise formadas na monocamada dos orifícios da placa foram observadas, contadas e os títulos virais determinados, segundo a seguinte fórmula:

$T = \log_{10}M + \log_{10}ID + \log_{10}FC$ , onde:

T = título expresso em log<sub>10</sub> PFU/mL;

M = média do n° de placas de lise contadas em uma determinada diluição;

ID= inverso da diluição onde as placas de lise foram contadas;

FC = fator de correção do inóculo para mL. Como o inóculo corresponde a 100 µL, que é a décima parte de 1,0 mL, FC = 1 (log<sub>10</sub> = 1).

#### **4.7. Biossegurança**

Todos os experimentos descritos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança, usando os EPI (equipamento de proteção individual) e EPC (equipamento de proteção coletiva) recomendados. Todas as amostras foram processadas em cabine de segurança biológica, previamente desinfetadas com solução de hipoclorito a 2% e solução RNase AWAY® (Invitrogen) e submetidas a luz ultravioleta por 15 minutos. Cada etapa do processamento das amostras (extração, síntese de cDNA e RT-qPCR) foi realizada em salas segregadas, com fluxo de pessoas unidirecional.

#### **4.8. Extração de RNA**

A extração de RNA viral das amostras foi realizada a partir de 140 µL de amostra com o kit “QIAamp® Viral RNA Mini kit” (QIAGEN®), segundo as especificações do fabricante. Foram obtidos 60 µL de RNA viral, resuspenso em tampão de eluição, e estocado a -80°C até o momento de uso. Em todos os ensaios, foi incluído um controle negativo que consistiu em soro humano negativo (Negative Quality Control Serum, NIBSC), e um controle positivo, no qual o vírus purificado foi diluído em soro humano negativo até a obtenção de uma concentração de 10<sup>3</sup> cópias/reação.

#### **4.9. Síntese da cadeia complementar**

A síntese do cDNA (transcrição reversa) foi realizada usando 20 µL de RNA viral adicionado a 20 µL do mix do kit “High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems), que emprega iniciadores aleatórios para a síntese da fita de DNA complementar. Foram obtidos 40 µL de cDNA e estocado a -80°C.

#### **4.10. Clonagem para obtenção das amostras padrão de quantificação**

A clonagem para obtenção das amostras padrão de quantificação foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia – LADTV do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). O vírus purificado por troca iônica, foi utilizado para a construção de uma curva padrão plasmidial, empregada nos ensaios de quantificação do vírus da febre amarela por RT-qPCR, utilizando o sistema TaqMan.

Para construção da curva padrão, o cDNA obtido foi amplificado para a detecção da região NS5 viral, uma região extremamente conservada do genoma viral, e posteriormente, esta região foi clonada utilizando o Kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante (Tabela 4.1, Tabela 4.2 e Tabela 4.3).

**Tabela 4.1.** Sonda TaqMan® e iniciadores usados na validação, para o alvo correspondente à região NS5 de Febre amarela (VFA) (Mantel e cols, 2008)

Oligonucleotídeo	Sequência 5'-3'
Oligonucleotídeo (+)	GCACGGATGTAACAGACTGAAGA
Oligonucleotídeo (-)	CCAGGCCGAACCTGTCAT
Sonda	F-CGACTGTGTGGTCCGGCCCATC-T

Tamanho do amplicom 83 pares de bases.

Concentração estoque de Oligonucleotídeos e sonda: 100µM.

Região amplificada: 9595–9677

**Tabela 4.2.** Reagentes empregados para a reação da RT-PCR convencional, para um volume final de 25 µL.

Mistura	Volume	Concentração final
AmpliAq Gold DNA Polymerase (5.0 Units/µL)	0,3 µL	1.5 Unidades/50 µL
dNTP	4,0 µL	2 mM (500 µM de cada dNTP)
Tampão 10X	2,5 µL	1X
MgCl <sub>2</sub>	1,5 µL	1.25 mM
Oligonucleotídeo (+)	1,0 µL	400 nM
Oligonucleotídeo (-)	1,0 µL	400 nM
H <sub>2</sub> O	5,5 µL	-----
Total	20 µL	-----
cDNA	5,0 µL	10 – 100 ng

**Tabela 4.3.** Ciclagem térmica usada na RT-PCR convencional.

	30 ciclos			ETAPA 3
	DESNATURAÇÃO	PAREAMENTO / EXTENSÃO		
ETAPA 1	CICLO			
10'	30''	30''	1'	7'
95°C	94°C	55°C	72°C	72°C

Tal procedimento gerou um amplicom da região NS5, confirmado pela visualização em gel de agarose a 2% da banda com peso molecular de 83 pares de bases, que foi usado como inserto para clonagem.

#### **4.10.1. Crescimento de células *Escherichia coli***

A linhagem das células de *E. coli* usada para a clonagem foi a One Shot® TOP10, cultivadas em meio LB (Luria-Bertani) e quando necessário, o meio foi suplementado com 10 µg/mL do antibiótico ampicilina (Amp). Para a confecção do meio Luria Bertani foram pesados 25 g do meio LB (Accumedia®) na balança analítica e em seguida foi acrescentada água destilada, completando-se o volume para 1 L. Para o preparo de meio sólido, 1 L do meio LB líquido foi acrescido de 15 g de ágar bacteriológico (Difco). Posteriormente, o meio foi esterilizado durante 15 minutos a 121°C e distribuído em placas de Petri. Composição do meio: digestão enzimática de caseína 10 g/L; Extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; pH 7,3 ± 0,2, a 25°C (Accumedia®).

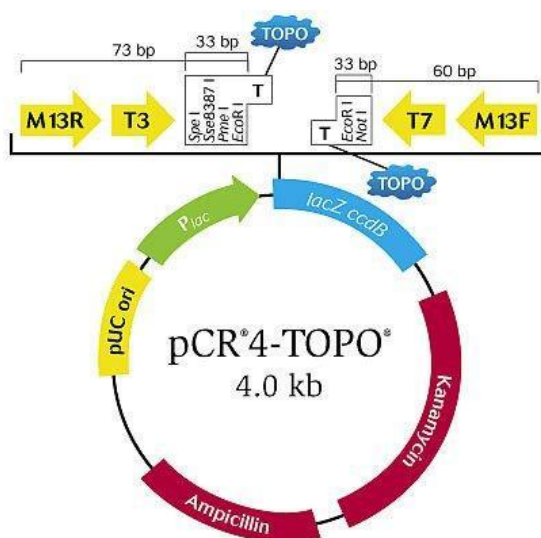
As células foram crescidas à 37°C sob agitação. Para culturas em meio sólido, 1,5% de ágar bacteriológico (Difco) foi adicionado ao meio LB. Para fins de estocagem, as linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio líquido por um período de 18 horas e em seguida, as culturas foram diluídas (1:1) em uma solução estéril de glicerol 80% e acondicionadas em um ultra freezer a -80°C.

#### **4.10.2. Preparo das células competentes de *E. coli***

Foi isolada uma colônia pura de *E. coli* e inoculada em 5 mL de LB sem antibiótico, e incubados a 37°C, durante aproximadamente 16 horas sob agitação de 250 rpm. Foi inoculado 100 µL da cultura em 50 mL de meio LB, e incubada a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> sob agitação de 250 rpm até atingir uma densidade óptica de 0,3 a 600 nm (D.O.600nm). Uma vez alcançada a DO desejada, a cultura foi resfriada, em gelo, por 10 minutos e redistribuída em tubos falcon estéreis com 40 mL de cultura em cada. Posteriormente, cada cultura foi centrifugada a 8.000 rpm durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Assim, para a lavagem do precipitado celular, a cada tubo foram adicionados 20 mL de uma solução, estéril e gelada, de cloreto de cálcio a 0,1 M e as células foram ressuspensas. Os tubos foram novamente centrifugados a 8.000 rpm por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante

descartado. O precipitado celular unificado foi ressuspensão em 1,8 mL de cloreto de cálcio e 0,2 mL da solução de glicerol 10% e alíquotas de 50 µL foram estocadas a -80°C.

Para análise da eficiência de transformação, uma alíquota (100 µL) com células competentes, congelada a -80°C, foi colocada no gelo durante 5 minutos. Em seguida adicionou-se 1 ng do plasmídeo pCR4-TOPO (Figura 4.2) (Invitrogen) e a mistura foi incubada por 20 minutos no gelo. Em seguida a mistura foi transferida para um banho maria por 2 minutos, previamente aquecido a 42°C. As amostras foram transferidas de volta ao gelo por 5 minutos. Após o choque térmico, alíquotas de células foram colocadas em tubos de 1,5 mL e adicionou-se às células 1 mL de meio LB a 37°C e foram incubadas a 37°C em banho maria, sob agitação lenta, por uma hora. Diluições de 1:10 (50 µL de células em 500 µL de LB líquido) e 9:10 (450 µL de células em 500 µL de LB líquido) foram semeadas em meio LB ágar líquido suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37°C durante 18 horas (*overnight*).



**Figura.4.2.** Esquema do vetor plasmidial e sítios de clonagem. Extraída de Invitrogen user manual. TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing Version O. 10 April 2006 25-0276.

Para uma eficiência ótima, calcula-se que o título ideal seja de  $10^5$  a  $10^6$  colônias por µg de plasmídeo vetor. Este valor é representado em CFU (unidade formadora de colônias) /µg de DNA plasmidial.

Fórmula:     n° de colônias    .

[DNA] utilizado (µg)

### 4.10.3. Transformação

O amplicon correspondente a região NS5 foi submetido a uma reação de ligação no vetor pCR4-TOPO® (TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing, Invitrogen). Para a ligação do produto da PCR (amplificação do cDNA viral) ao plasmídeo, foram adicionados 10,0 ng do vetor TOPO, e 2,0 µL do inserto e água estéril destilada para um volume final de 5,0 µL. A mistura foi vortexada e deixada 5 minutos, a temperatura ambiente e após este período foi mantida a -20°C até a o momento do uso. O produto da ligação foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* TOP10 preparadas de acordo com o protocolo descrito no item 4.8.1, com eficiência de  $1 \times 10^7$  UFC por micrograma de DNA.

A transformação foi conduzida por choque térmico seguindo-se os mesmos parâmetros descritos no item 4.8.3. Para tanto, uma alíquota (2,5 µL) do produto da ligação foi misturado com 50 µL de células competentes e incubado no gelo por 30 minutos. Em seguida, foi transportado para o banho maria previamente aquecido a 42° por 30 segundos. Imediatamente, foi colocado no gelo por 5 minutos. Após o choque térmico, foi acrescentado LB líquido e incubado a 37°C por 1 hora com agitação de 250 rpm.

O processo de seleção dos transformantes consistiu em semear alíquotas de 50 µL, 100 µL e o restante (850 µL centrifugados), da suspensão de células em placas de Petri contendo meio LB ágar suplementado com 50 µg/mL de ampicilina. As culturas foram mantidas a 37°C por aproximadamente 18 horas. Após este período, as placas foram avaliadas quanto à presença de colônias resistentes à ampicilina. A etapa seguinte consistiu na seleção de clones para proceder com a extração de plasmídeos e confirmar a presença do inserto nos mesmos.



#### 4.10.4. Extração do DNA plasmidial de *Escherichia coli* TOP10

Cada colônia selecionada foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo 50 µL/mL de ampicilina e mantidos, por cerca de 18 horas, a 37°C sob agitação. O inóculo foi transferido para tubos de microcentrífuga e procedeu-se com a extração de plasmídeos com o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega), conforme recomendações do fabricante, a partir de 5 µL de cultura. A presença e a qualidade dos plasmídeos foram verificadas através do sequenciamento de ácidos nucleicos foi feito pelo método da terminação da cadeia por dideoxiribonucleotídeo (ddNTP) descrito por Sanger em 1977 utilizando o mix Big Dye Terminator versão 3.1 (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. Os produtos da amplificação foram sequenciados em um aparelho ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) pela Plataforma Multi-usuário de sequenciamento – PDTIS/FIOCRUZ. As sequências foram analisadas por meio do programa Chromas v. 3.0 (Technelysium Pty Ltd) e do SeqManII do conjunto Lasergene, v.8.0 (DNASTar, Inc.).

#### 4.10.5. Quantificação do DNA Plasmidial

O DNA plasmidial foi quantificado usando o espectrofotômetro Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific) no comprimento de onda de 260 nm, onde 2 µL do DNA extraído foram dosados e sua concentração foi calculada a partir da equação abaixo. A concentração encontrada (em g/µL) é dividida pelo tamanho do plasmídeo (em pares de bases) multiplicado por 660 (peso molecular de 1 mol de plasmídeo) e multiplicada pelo número de Avogadro ( $6,022 \times 10^{23}$ ) para encontrar a concentração do plasmídeo contendo o vírus.

Equação de conversão da concentração obtida em g/uL para número moléculas/uL.

$$([\text{DNAg}/\mu\text{L}]/\text{tamanho do transcrito} \times 660) \times 6,022 \times 10^{23} .$$

#### 4.11. Otimização da concentração dos oligonucleotídeos e sonda da RT-qPCR.

Com o objetivo de definir a melhor concentração dos oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 4.1) para a reação de RT-qPCR, três concentrações distintas de cada Oligonucleotídeo foram combinadas formando 9 pares de concentrações diferentes (Tabela 4.4). A diluição do vírus utilizado nestes ensaios foi de  $10^4$  cópias/reação e a concentração da sonda Taqman foi fixada em 150 nM.

**Tabela 4.4.** Esquema com a variação da concentração dos oligonucleotídeos iniciadores em nanoMolar (nM).

Oligonucleotídeo negativo	Oligonucleotídeo positivo		
	100	300	600
100	100/100	300/100	600/100
300	100/300	300/300	600/300
600	100/600	300/600	600/600

#### Otimização da concentração da sonda TaqMan®

Uma vez estabelecida a concentração ideal do par de Oligonucleotídeos, foi determinada a concentração de sonda para emissão de sinal fluorescente com o menor valor de Ct, *cycle threshold* (Ct – ciclo onde a reação cruza o limiar de detecção, o *threshold*. Será neste ponto que os valores da intensidade de sinal serão coletados e utilizados para a quantificação das amostras). Para este ensaio foram empregados 6 concentrações distintas de sonda TaqMan, variando de 50nM a 175 nM (Tabela 4.5). Cada amostra com a concentração de sonda específica foi aplicada na placa em 8 réplicas. A diluição do vírus utilizado no ensaio foi de  $10^4$ . A análise dos dados revelou qual a melhor concentração de sonda a ser adotada na rotina laboratorial.

**Tabela 4.5.** Condições da mistura de reação dos reagentes para o ensaio de otimização da concentração de sonda TaqMan.

Mistura	Volume	Concentração final
<b>TaqMan Master Mix 2X</b>	12,5µL	<b>1 X</b>
<b>Oligonucleotídeo (+)</b>	0,75µL	<b>300 nM</b>
<b>Oligonucleotídeo (-)</b>	0,75µL	<b>300 nM</b>
<b>sonda</b>	0,12µL- 0,44 µL	<b>50 nM-175nM</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	5,88 µL – 5,56 µL	-----
<b>Total</b>	20 µL	-----
<b>cDNA</b>	<b>5,0 µL</b>	-----

#### 4.12. RT-PCR em tempo real

A RT-PCR em tempo real foi realizada usando o Kit TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Nas Tabelas 4.6 e 4.7 estão demonstradas as condições de ciclagem e concentrações dos reagentes utilizados. Os oligonucleotídeos e sondas testados estão descritos no tópico 4.9. Em todos os ensaios foi incluído um NTC (*No Template Control*), que constitui um controle negativo da reação, com a mistura de reagentes sem adição de amostra. Alguns termos usados em RT-qPCR e que devem ser mencionados são: *threshold* (nível de fluorescência onde o sinal é detectado deve ser sempre realizado na fase exponencial) e *Rn* (sinal do *reporter* dividido pelo sinal de referência passiva, sinal do ROX. Normalização empregada para corrigir erros de pipetagem).

**Tabela 4.6.** Ciclagem térmica da RT-qPCR. Etapas com respectivos tempos e temperaturas usadas.

		40 ciclos	
		DESNATURAÇÃO	ANEL/EXTENSÃO
HOLD	HOLD	CICLO	
2'	10'	15''	1'
50°C	95°C	95°C	60°C

**Tabela 4.7.** Reagentes empregados para a reação da RT-qPCR para um volume final de 25  $\mu$ L.

Mistura	Volume	Concentração final
<b>TaqMan® Master Mix 2X</b>	12,5 $\mu$ L	<b>1 X</b>
<b>Oligonucleotídeo (+)</b>	0,75 $\mu$ L	<b>300 nM</b>
<b>Oligonucleotídeo (-)</b>	0,75 $\mu$ L	<b>300 nM</b>
<b>sonda</b>	0,38 $\mu$ L	<b>150 nM</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	5,5 $\mu$ L	-----
<b>Total</b>	20 $\mu$ L	-----
<b>cDNA</b>	<b>5,0 <math>\mu</math>L</b>	<b>10 – 100 ng</b>

#### 4.13. Construção da curva padrão

A curva padrão foi construída a partir de diluições seriadas na base 10 do DNA plasmidial da concentração  $10^9$  cópias/reação até  $10^2$  cópias/reação. Essa faixa foi escolhida por ser capaz de quantificar amostras propagadas *in vitro* (amostras de biorreator). Também foram selecionados 6 pontos ( $10^7$ - $10^2$  cópias), para atender os ensaios com amostras posteriores .

#### 4.14. Determinação da sensibilidade do teste

A curva padrão, confeccionada a partir de diluições na base 10, até 100 cópias de DNA plasmidial na base e 2 a partir de 100 cópias até 1,5 cópias, e essas diluições foram repetidas 8 vezes por ensaio. A diluição que apresentou a menor concentração e detectou-se 50% das réplicas, foi selecionada como sendo o limite de detecção (LD) do ensaio. Nestes ensaios também foi possível determinar o limite de quantificação (LQ), através da seleção ao escolher o ponto de menor concentração que apresentou pouca variação, mantendo a linearidade.

#### 4.15. Precisão intermediária

Para avaliar a repetibilidade e a reprodutibilidade do ensaio de RT-qPCR para febre amarela, foram empregadas amostras de vírus purificado reconstituído em soro humano negativo (Negative Quality Control Serum, NIBSC), constituindo um painel sorológico, representado por três concentrações virais: **alta** com carga viral de  $10^4$  cópias/reação, **média** com  $10^3$  cópias/reação e **baixa** com  $10^2$  cópias/reação do vírus de febre amarela, adicionadas à soro humano de indivíduo saudável. Essas amostras foram aplicadas em oito réplicas. Da mesma forma, foram avaliadas amostras clínicas em *pool* (diversas amostras de soro humano de pacientes vacinados) representando três concentrações do vírus da febre amarela, **alta** com carga viral de  $10^3$  cópias/reação, **média** com  $10^2$  cópias/reação e **baixa** com 50 cópias/reação. As amostras clínicas foram aplicadas em 10 réplicas. Os experimentos foram autorizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas IPEC/FIOCRUZ através do parecer 058/2008.

Os ensaios foram realizados por dois operadores diferentes e repetidos em quatro vezes no caso do painel sorológico, dois realizados no mesmo dia e dois ensaios realizados em dias diferentes. Para as amostras clínicas, devido ao pequeno número de amostras, foram realizados três ensaios distintos, dois no mesmo dia com operadores diferentes e um realizado em dia diferente pelo mesmo operador, totalizando sete ensaios.

#### 4.16. Especificidade

Para avaliar a especificidade do ensaio, o uso de outro *flavivírus* foi fundamental. Assim foram usados diferentes sorotipos de Dengue (Dengue 1, Dengue 2 e Dengue 3) e o vírus da encefalite japonesa (VEJ), totalizando 4 amostras distintas. Como controle positivo foi usado o vírus da febre amarela VFA propagado em cultura celular. Em todos os ensaios foram aplicados os controles negativos que consistiam em soro humano negativo (NIBSC).

#### 4.17. Especificidade analítica

Para avaliar a interferência da presença de outros vírus na quantificação da carga viral das amostras, a curva padrão para o vírus da febre amarela foi diluída em um pool de RNA viral, contendo os vírus da Dengue sorotipo 1, 2 e 3, o Vírus da Caxumba (MuV) e o Vírus do Sarampo (MV), assim como em soro humano de indivíduo saudável (NIBSC). Também foi usado soro humano de indivíduo saudável (NIBSC) sem a adição de qualquer vírus como controle negativo.

#### 4.18. Gene de Referência

##### 4.18.1. Controle interno endógeno

Para garantir a qualidade do teste, excluindo a possibilidade de falso negativos devido à presença de inibidores da reação, ou da qualidade e integridade do cDNA das amostras, foi usado um controle interno endógeno comercial fornecido pelo kit TaqMan® RNase P Detection Reagents (Applied Biosystems), onde a sonda TaqMan é marcada com o fluoróforo VIC/MGB, de acordo com as especificações do fabricante. Este controle interno foi aplicado nos ensaios para verificação da precisão intermediária do método, nos experimentos com amostras reconstituídas de soro humano contendo diluições seriadas do vírus purificado após propagação assim como em amostras de soro humano negativo (NIBSC), tanto em multiplex (para o alvo genômico viral e para o alvo humano), como em reações separadas durante um mesmo ensaio (mesma placa), a fim de avaliar a eficiência do método para a detecção dos dois alvos em uma mesma reação e, se haveria interferência no caso das duas reações ocorrendo concomitantemente.

**Tabela 4.8.** Ciclagem térmica da RT-qPCR. Etapas com respectivos tempos e temperaturas usadas.

		40 ciclos	
		DESNATURAÇÃO	ANEL/EXTENSÃO
HOLD	HOLD	CICLO	
2'	10'	15''	1'
50°C	95°C	95°C	60°C

**Tabela 4.9.** Reagentes empregados para a reação da RT-qPCR em multiplex para um volume final de 25 µL.

Mistura	Volume	Concentração final
<b>TaqMan® Master Mix 2X</b>	12,5µL	<b>1 X</b>
<b>Oligonucleotídeo (+)</b>	0,75µL	<b>300 nM</b>
<b>Oligonucleotídeo (-)</b>	0,75µL	<b>300 nM</b>
<b>sonda</b>	0,38µL	<b>150 nM</b>
<b>TaqMan® Gene Expression Assays (VIC® dye-labeled MGB probe)</b>	0,5 µL	<b>900nM Oligonucleotídeo (+) 900nM Oligonucleotídeo (-) 250 nM Sonda</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	5,5 µL	-----
<b>Total</b>	20 µL	-----
<b>cDNA</b>	<b>5,0 µL</b>	<b>10 – 100 ng</b>

#### 4.18.2. Controle interno exógeno

Para garantir a qualidade do ensaio com amostras provenientes de biorreatores, onde o vírus propagado está em meio livre de soro humano, foi usado um controle interno exógeno, diferente da RNase P. Para tal empregou-se o kit TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents VIC™Probe (Applied Biosystems), de acordo com as especificações do fabricante, onde neste caso, 5,6 µL do DNA do controle exógeno 50X é adicionado à amostra antes da extração do RNA. Os ensaios foram realizados em multiplex.

**Tabela 4.10.** Ciclagem térmica da RT-qPCR. Etapas com respectivos tempos e temperaturas usadas.

		40 ciclos	
		DESNATURAÇÃO	ANEL/EXTENSÃO
HOLD	HOLD	CICLO	
2'	10'	15''	1'
50°C	95°C	95°C	60°C

**Tabela 4.11.** Reagentes empregados para a reação da RT-qPCR multiplex para um volume final de 25 µL.

Mistura	Volume	Concentração final
<b>TaqMan® Master Mix 2X</b>	12,5µL	<b>1 X</b>
<b>Oligonucleotídeo (+)</b>	0,75µL	<b>300 nM</b>
<b>Oligonucleotídeo (-)</b>	0,75µL	<b>300 nM</b>
<b>sonda</b>	0,38µL	<b>150 nM</b>
<b>Exo IPC Mix 10X</b>	4,0 µL	<b>2X</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	5,5 µL	-----
<b>Total</b>	20 µL	-----
<b>cDNA</b>	<b>5,0 µL</b>	<b>10 – 100 ng</b>

#### 4.19. Teste de diferentes oligonucleotídeos iniciadores.

Diferentes oligonucleotídeos iniciadores para os alvos NS3 e 3'UTR do vírus da febre amarela (Figura 4.2) foram testados pelo sistema SYBR® Green de RT-qPCR para avaliar o desempenho dos mesmos quando comparados com os iniciadores para a região NS5. Neste caso, para o uso de SYBR Green, apenas os Oligonucleotídeos senso e anti-senso são adicionados à mistura da reação, ocorrendo em uma única etapa, que inclui a transcrição reversa, diferente da descrita pelo sistema TaqMan. Através da curva padrão plasmidial, o vírus purificado foi quantificado através de diluições seriadas na base 10 e 2 contendo 10<sup>7</sup> até 50 cópias/reação. As condições da reação estão demonstradas nas (Tabela 4.9 e 4.10). Estes experimentos tiveram como objetivo avaliar a possível formação de dímeros dos conjuntos de oligonucleotídeos testados, além de comparar a sensibilidade e desempenho dos iniciadores para as amostras com baixo número de cópias virais.

NS3 sense	AggTCCAgTTgATCgCggC
NS3 antisense	gAgCgACAgCCCCgATTTCT
3'UTR sense	AACCCACACATgCAggACAA
3'UTR antisense	GTTgCAggTCAgCATCCACA



**Figura 4.3.** Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores, descritos por Bae e cols. 2003, usados para a comparação com a região NS5 viral.

**Tabela 4.12.** Concentração dos reagentes do ensaio usando o sistema SYBR® Green de RT-qPCR.

Mistura RT-qPCR		
Mistura	Volume	Concentrações finais
SuperMix Express SYBR® Green ER com ROX 2X	10,0 µL	1X
Oligonucleotídeo (+)	0,4 µL	200 nM
Oligonucleotídeo (-)	0,4 µL	200 nM
Enzima SuperScript III Platinum SYBR® Green	0,5 µL	
H <sub>2</sub> O	3,7 µL	-----
<b>Total</b>	<b>15,0 µL</b>	
<b>RNA</b>	<b>5,0 µL</b>	<b>1 pg–1 µg</b>

**Tabela 4.13.** Ciclo da PCR em tempo real com respectivos tempos e temperaturas utilizadas.

		40 ciclos		CURVA DE DISSOCIAÇÃO			
		DESNATURAÇÃO	ANEL/EXTENSÃO				
HOLD	HOLD	CICLO					
5'	2'	15''	1'	15''	1'	30''	15''
50°C	95°C	94°C	60°C	95°C	60°C	95°C	60°C

#### 4.20. Correlação entre PFU/mL e Cópias/mL

Com o objetivo de correlacionar PFU/mL e Cópias/mL, analisamos a quantificação de amostras do vírus da febre amarela propagadas *in vivo* e *in vitro* por PCR em tempo real e por ensaio de placa de lise. Para esta correlação utilizamos amostras de cinéticas em garrafas estacionárias, em biorreatores e em

*cell factories*, que são sistemas projetados para a cultura em larga escala de células e produção de biomateriais, tais como vacinas, anticorpos monoclonais, etc, fornecendo uma extensa superfície para o crescimento em espaço limitado. Alguns benefícios são o baixo risco de contaminação e de fácil manuseio das multicamadas de pilhas.

Para a cinética de biorreatores, foram analisadas amostras do dia da coleta (referente ao 4º dia após a inoculação), de quatro lotes diferentes (Lote 4, 6, 7 e 8). Na curva de propagação viral em garrafa estacionária, alíquotas foram retiradas de hora em hora nas primeiras 6 horas e posteriormente de 24 em 24 horas, durante 7 dias. Para a curva de propagação viral em *cell factory*, foram analisadas amostras de duas cinéticas durante 7 dias.

Além disso, também analisamos amostras de soro de 4 primatas não humanos, macaco Rhesus (*Macaca mulata*) cedidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). O experimento foi autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ através da licença LW-22/12 com validade até 12/04/2016. Os animais foram imunizados por via subcutânea com a vacina 17DD produzida em Bio-Manguinhos. As amostras foram coletadas com o intervalo de 2, 4, 6, 8 e 10 dias após a infecção. Todas as amostras foram analisadas por ensaio de placa de lise e RT-qPCR em tempo real.

#### **4.21. Análise estatística**

O desvio-padrão (DP) é uma medida de dispersão absoluta que descreve os desvios de resultados com relação à média. O coeficiente de variação (CV) é uma medida de dispersão relativa, correspondendo ao desvio-padrão expresso como a porcentagem da média. Quanto menor o CV mais homogêneo é o conjunto de dados (Toledo e Ovalle, 1995a). Coeficientes de variação menores que 20% são aceitos para ensaios biológicos (ANVISA, 2003).

Calculou-se as médias, os desvios-padrão e coeficientes de variação dos resultados de precisão intermediária, para determinar se os mesmos estavam de acordo com o critério de aceitação já citado.

O coeficiente de correlação de Pearson é uma medida do grau de relação linear entre duas variáveis quantitativas. Este coeficiente varia entre valores de -1 e 1. O valor 0 (zero) significa que não há relação linear, o valor 1 indica uma relação linear perfeita e o valor -1 significa uma relação linear perfeita mas inversa, ou seja quando uma aumenta a outra diminui. Quanto mais próximo estiver de 1 ou -1, mais forte é a associação linear entre as duas variáveis (Toledo e Ovalle, 1995b).

O coeficiente de correlação de Pearson determinou a correlação nos ensaios que avaliaram a especificidade analítica, a quantificação pela curva padrão plasmidial e estimada por placa de lise e a correlação entre o ensaio de placa de lise e RT-qPCR. Os resultados obtidos foram organizados no Microsoft Excel 2010 e as análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism® versão 5.01.

## 5. Resultados

### 5.1. Clonagem

Para iniciar a padronização do PCR em Tempo Real, o primeiro passo foi construir uma curva padrão que nos permitisse avaliar a quantidade de partículas virais presente tanto em amostras clínicas, quanto em amostras de vírus cultivadas *in vitro*. A primeira curva utilizada no estudo foi construída a partir de uma amostra de vírus cultivada *in vitro* e purificada por troca iônica. Essa amostra foi titulada por ensaios de placa de lise e a partir da premissa de um placa de lise ser originado de uma partícula viral, a quantidade de cópias foi estimada por RT-qPCR usando o sistema TaqMan, a partir de diluições seriadas na base 10, utilizadas para a confecção da curva padrão ou curva de calibração. Esta curva inicialmente, não nos permitia uma quantificação real do número de cópias e sim um valor estimado. Neste sentido, para se ter um valor mais acurado a região NS5 do vírus febre amarela foi clonada no plasmídeo TOPO. A análise do sequenciamento confirmou a presença do inserto no plasmídeo.

### 5.2. Obtenção da Curva Padrão

Baseado na estimativa da concentração de plasmídeos contendo a região NS5 viral verificada no Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific) foi calculado o número de cópias plasmidial, como demonstrado abaixo (Figura 5.1).

	(ng/uL)	(g/uL)
Concentração	36,7	3,67E-08
		(pb)
Tamanho do Plasmídeo		3900

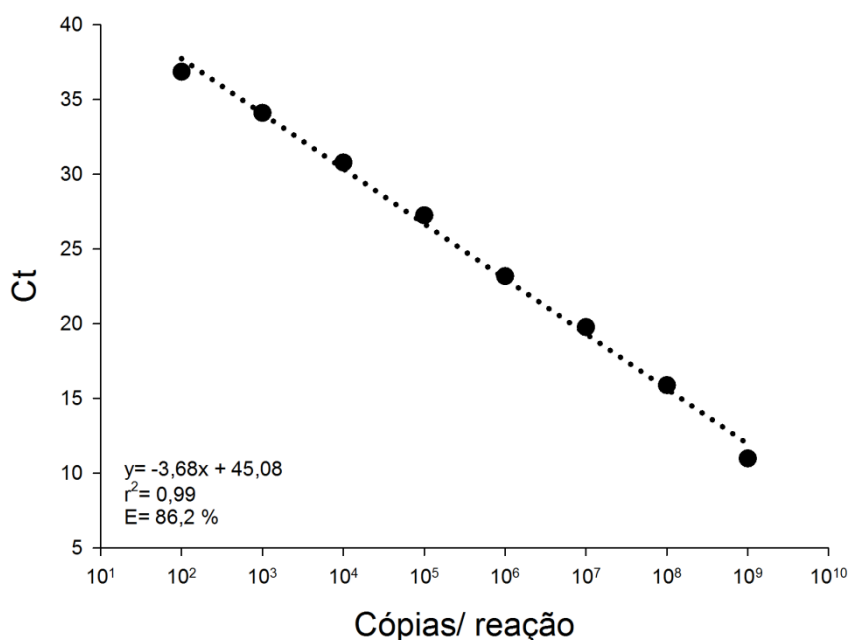
$\frac{\text{Concentração (g/uL)}}{[\text{Tamanho do Plasmídeo (pb)}] \times 660} \times (6,022 \times 10^{23})$
--

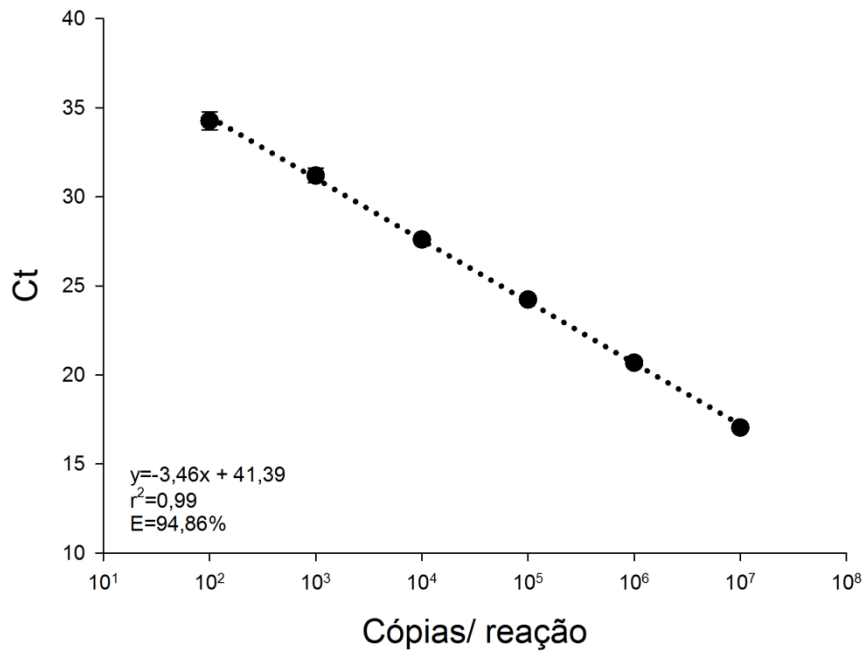
Moléculas/uL	8,59E+09
--------------	----------

**Figura 5.1.** Fórmula descrita no manual Princípio da PCR em tempo real (Applied Biosystem). Os seguintes parâmetros foram usados para converter a concentração obtida em g/uL para número de moléculas/uL: a concentração em g/uL dividida pelo tamanho do plasmídeo em pares de bases multiplicado pelo peso molecular médio de 1 pb de DNA =660 g/mol; multiplicado por 1 mol de moléculas (número de Avogrado) =  $6,02 \times 10^{23}$  moléculas.

Para construir uma curva padrão que nos permitisse acompanhar a cinética viral *in vitro*, diluições seriadas na base 10 do plasmídeo recombinante foram feitas a partir do ponto de  $10^9$  cópias até o ponto  $10^2$  (Figuras 5.2 e 5.3). Em ambas as curvas, as amostras referentes a cada ponto de diluição, foram aplicadas em triplicata na placa e após a corrida, os parâmetros “Slope” (próximo a -3,32),  $R^2$  ( $\geq 0,99$ ) e Eficiência (próximo a 100%) foram analisados e avaliados, segundo as especificações da Applied Biosystem. Os resultados apresentaram “Slope” de -3,593 e -3,351,  $R^2$  de 0,991 e 0,999 e Eff% (Eficiência) de 89,81 e 98,78, como demonstrado nas Figuras 5.2 e 5.3, respectivamente, e, portanto, dentro das especificações fornecidas pela Applied Biosystems.

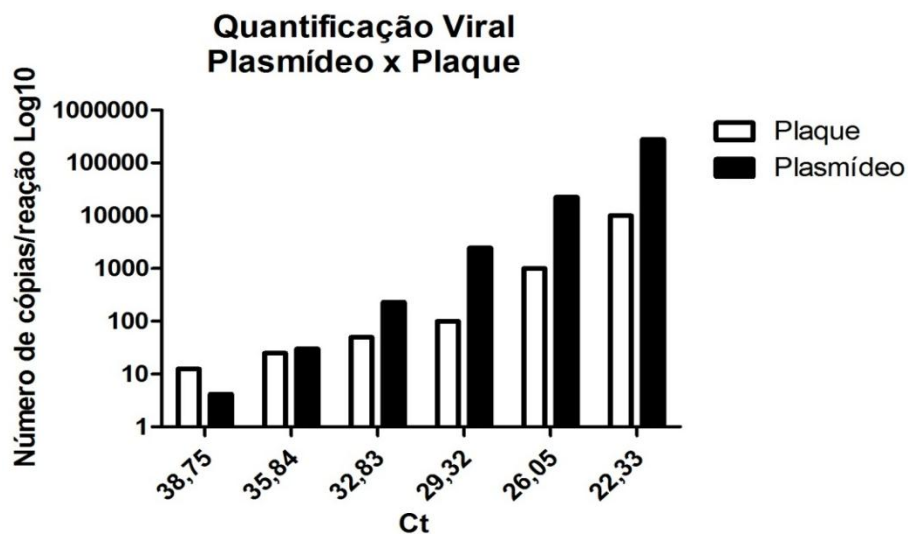


**Figura 5.2.** Curva padrão com 8 pontos da diluição a fim de verificar o desempenho da amplificação pelo sistema TaqMan, através da avaliação dos parâmetros da curva padrão (slope, intercepto,  $R^2$  e eficiência). Esta curva foi usada para os ensaios de quantificação de amostras de título viral mais elevado (biorreatores, por exemplo).



**Figura 5.3.** Curva padrão com 6 pontos de diluição que foram usados nos experimentos com amostras clínicas, as quais possuem uma carga viral relativamente baixa.

A fim de avaliar a diferença na quantificação entre a curva padrão usada antes da clonagem, onde a quantidade de cópias era estimada a partir do título viral, e a curva padrão plasmidial, fizemos um ensaio comparativo entre as duas curvas (Gráfico 5.1) e obtivemos um resultado estatisticamente significativo quando analisamos pelo coeficiente de correlação de Pearson no programa GraphPad Prism® versão 5.01.

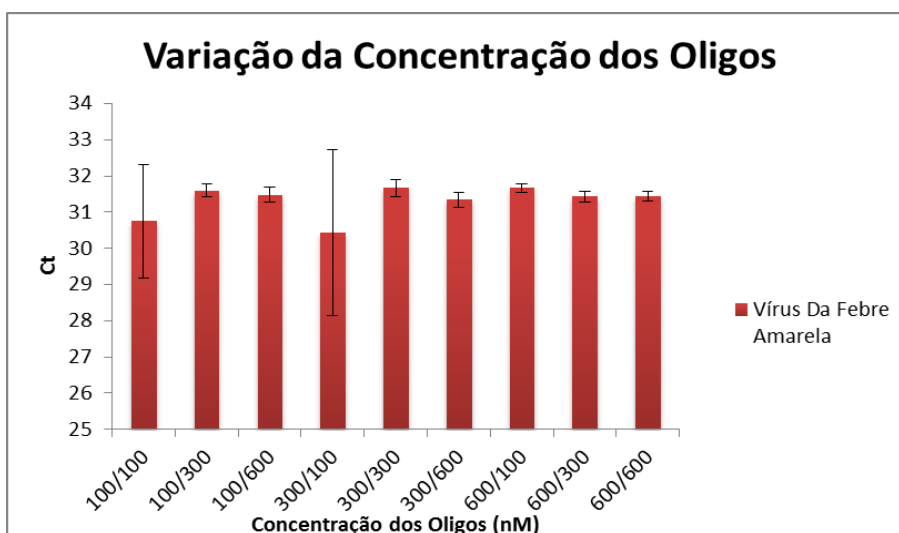


**Gráfico 5.1** – Análise comparativa entre, a curva quantificada por placa de lise e a curva plasmidial adotada posteriormente. Valor de P: < 0.0001. Diferença estatisticamente significativa quando avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson.

### 5.3. Otimização dos oligonucleotídeos iniciadores e sonda.

#### 5.3.1. Otimização dos oligonucleotídeos iniciadores para a região NS5 viral

Para avaliar a melhor concentração de oligonucleotídeos a ser usada nos experimentos, variamos apenas a concentração dos oligonucleotídeos iniciadores e fixamos a concentração de sonda em 150 nM. Os resultados obtidos foram analisados (Gráfico 5.2). A concentração que apresentou a menor variação e bom desempenho na quantificação usando a menor concentração de oligonucleotídeos foi a de 300/300 nM, logo a concentração escolhida para uso nos experimentos seguintes.

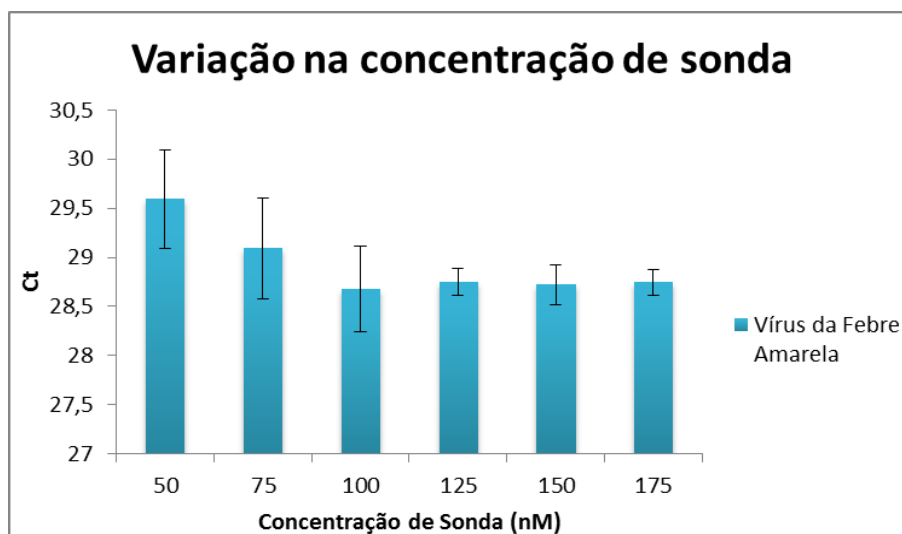


**Gráfico 5.2** – Variação das concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores, valores de Ct encontrados para a mesma concentração de vírus ( $10^4$  cópias/ reação) e seus respectivos desvios padrão.

#### 5.3.2. Otimização da sonda TaqMan para a região NS5 viral

Para testar a melhor concentração de sonda a ser usada, realizamos um experimento variando apenas a concentração da sonda TaqMan e fixando a concentração dos oligonucleotídeos iniciadores em 300/300 nM. A menor concentração de sonda que apresentou o menor desvio padrão e ao mesmo tempo

forneceu o menor valor de Ct foi 125nM, logo foi a concentração escolhida para os ensaios posteriores.



**Gráfico 5.3** – Variação da concentração da sonda, valores de Ct encontrados para a mesma concentração de vírus ( $10^4$  cópias/ reação) e seus respectivos desvios padrão.

#### 5.4. Linearidade, Limite de Detecção e Limite de Quantificação.

Com o objetivo de avaliar a linearidade, ou seja, a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado, esgotamos a curva padrão plasmidial através de diluições, a partir do ponto  $10^7$  cópias/reação até 1,5 cópias/reação. Abaixo do ponto 12,5 não houve mais a detecção de cópias virais (Tabela 5.1), assim como no controle negativo utilizado nos experimentos. A linearidade do teste foi comprovada, pois a variação entre as diluições foi linear até o ponto  $10^2$  cópias/reação, onde termina a faixa reportável do método. Apesar do ensaio detectar até 12,5 cópias/reação, o limite de detecção observado foi de 25 cópias/reação, pois esta diluição possibilitou a amplificação de pelo menos 50% das replicatas testadas (Tabela 5.1). O limite de quantificação foi estabelecido na concentração de 100 cópias/reação, por ser a menor concentração com a qual o método permitiu a detecção de todas as replicatas testadas e estar incluído dentro da faixa de concentração reportável do teste (Limite de Detecção).



**Tabela 5.1.** Determinação dos limites de quantificação (LQ) e detecção (LD).

Número de Cópias	Média Ct	Número de poços detectados	Observação
$10^7$	16,93	8/8	
$10^6$	20,59	8/8	
$10^5$	24,08	8/8	
$10^4$	27,50	8/8	
$10^3$	31,10	8/8	
$10^2$	34,17	8/8	LQ
50	34,88	5/8	
25	35,53	5/8	LD
12,5	36,13	3/8	
6,25	-	0/8	

### 5.5. Precisão intermediária

Para analisar a variação do método, os ensaios foram repetidos pelo mesmo operador em dias diferentes e por operadores diferentes no mesmo dia. Dois painéis foram construídos para essa análise: (i) um painel sorológico com amostras reconstituídas contendo amostras com carga viral alta de  $10^4$  cópias/reação, média com  $10^3$  cópias/reação e baixa  $10^2$  cópias/reação do vírus de febre amarela, adicionadas ao soro humano de indivíduo saudável e, (ii) um painel construído a partir de um pool de amostras clínicas (soro humano de pacientes vacinados com a vacina febre amarela 17DD), com carga viral de  $10^3$  cópias/reação, um pool com  $10^2$  cópias/reação e um pool com 50 cópias/reação do vírus da febre amarela. Os dois painéis foram processados por dois operadores diferentes, repetidos em quatro ensaios distintos. No caso do painel sorológico, foram realizados dois ensaios no mesmo dia e dois outros ensaios realizados em dias diferentes. No caso do painel de amostras clínicas, foram realizados três ensaios distintos, dois realizados no mesmo dia e um realizado em dia diferente, totalizando sete ensaios.

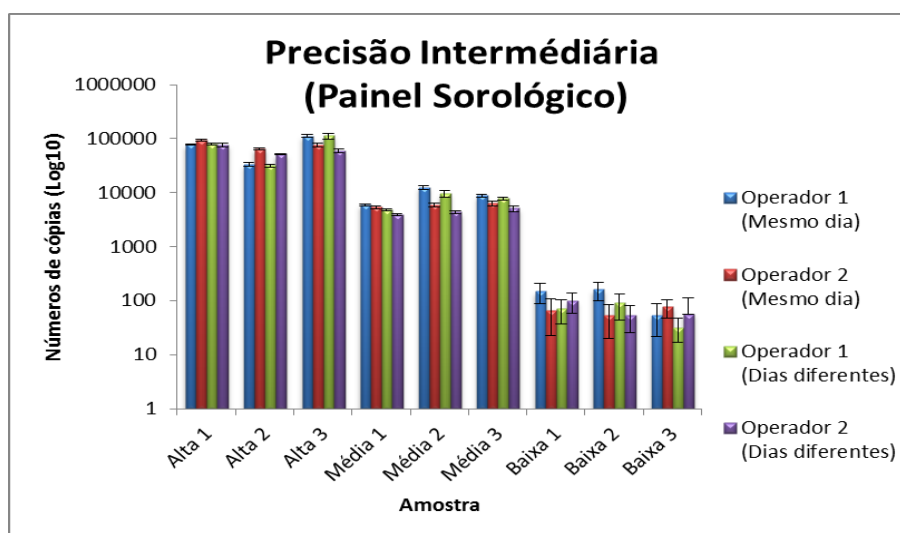
Painel sorológico de amostras reconstituídas experimentalmente.

**Tabela 5.2.** Resultados em cópias/reação dos ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade do painel sorológico (vírus reconstituído em soro).

Amostra	Operador 1 (MD*)	Operador 2 (MD*)	Operador 1 (DD**)	Operador 2 (DD**)
<b>Alta 1</b>	77908,36	94165,33	79864,08	75903,05
<b>Alta 2</b>	33065,27	64650,82	31386,81	51470,59
<b>Alta 3</b>	111554,20	75916,64	111786,03	59783,28
<b>Média 1</b>	5917,72	5296,17	4805,03	3899,60
<b>Média 2</b>	12396,53	5957,64	9601,86	4352,00
<b>Média 3</b>	8706,92	6331,21	7782,06	5092,87
<b>Baixa 1</b>	147,96	65,77	70,91	97,66
<b>Baixa 2</b>	159,74	53,40	90,13	54,20
<b>Baixa 3</b>	54,45	76,38	31,89	55,98

\*Experimentos realizados pelos operadores 1 e 2 no mesmo dia.

\* Experimentos realizados pelos operadores 1 e 2 em dias distintos.

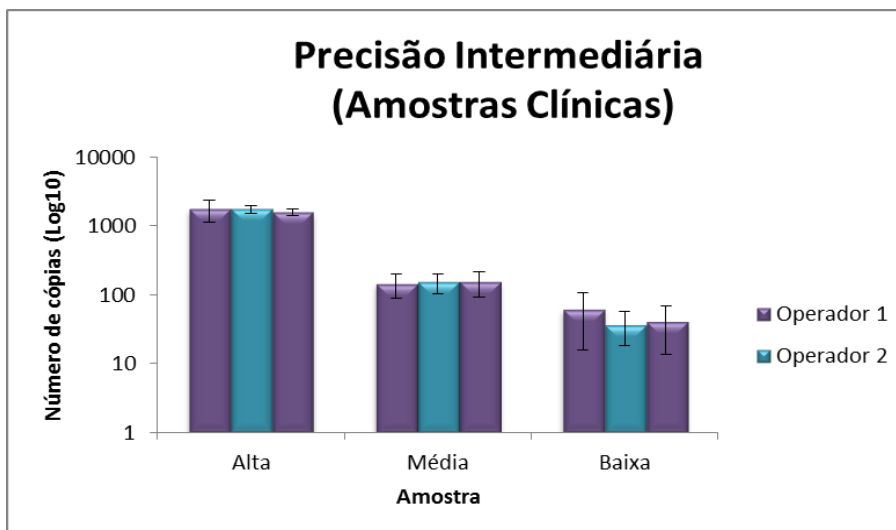


**Gráfico 5.4** – Análise da precisão intermediária a partir do painel sorológico contendo amostras com carga viral alta de  $10^4$  cópias/reação, média com  $10^3$  cópias/reação e baixa  $10^2$  cópias/reação do vírus febre amarela, adicionadas ao soro humano e seus respectivos desvios padrão. As amostras foram processadas por dois operadores diferentes e repetidas em quatro ensaios distintos, dois realizados no mesmo dia e dois ensaios realizados em dias diferentes.

Amostras clínicas

**Tabela 5.3.** Resultados em cópias/reação dos ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade do painel de amostras clínicas.

Amostra	Operador 1	Operador 2	Operador 1
<b>Alta</b>	1764,356	1770,084	1568,415
<b>Média</b>	146,2447	153,1703	153,7357
<b>Baixa</b>	61,96274	37,34988	40,72673



**Gráfico 5.5** – Análise da precisão intermediária a partir do painel de amostras clínicas, representadas em três concentrações do vírus febre amarela: alta com carga viral de  $10^3$  cópias/reação, média com  $10^2$  cópias/reação e baixa com 50 cópias/reação do vírus da febre amarela e seus respectivos desvios padrão. As amostras foram processadas por dois operadores diferentes e repetidas em três ensaios distintos, dois realizados no mesmo dia e um ensaio realizado em dia diferente.

## 5.6. Avaliando a especificidade

### 5.6.1. Especificidade

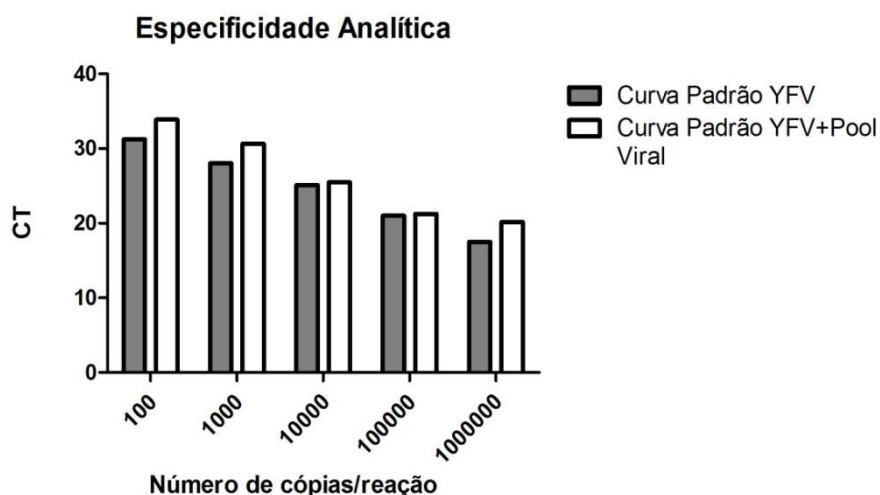
Com objetivo de avaliar a especificidade do teste para febre amarela, analisamos também amostras de outros *flavivírus* (Dengue 1, 2 e 3 e Encefalite Japonesa). Este ensaio demonstrou apenas a detecção do vírus de febre amarela, comprovando a especificidade do teste. (Tabela 5.4).

**Tabela 5.4** – Análise da especificidade do método. Os valores de Ct correspondem à detecção em diferentes número de cópias para o vírus da Febre Amarela (VFA). Amostras vírus Dengue (DENV 1, 2 e 3) e vírus da Encefalite Japonesa (VEJ) não apresentaram amplificação.

Amostra	Ct
Febre amarela 10 <sup>6</sup> Cópias/reação	19,31
Febre amarela 10 <sup>5</sup> Cópias/reação	22,76
Febre amarela 10 <sup>4</sup> Cópias/reação	25,78
Febre amarela 10 <sup>3</sup> Cópias/reação	29,6
Febre amarela 10 <sup>2</sup> Cópias/reação	34,54
Dengue 1	Indeterminado
Dengue 2	Indeterminado
Dengue 3	Indeterminado
Encefalite Japonesa	Indeterminado
Controle Negativo	Indeterminado

### 5.6.2. Especificidade Analítica

Amostras clínicas (soro humano) podem apresentar mais de um componente viral e para avaliar o quanto a presença de outros vírus poderia interferir na quantificação do nosso alvo, foi realizado um ensaio de especificidade analítica, no qual preparamos um *pool* contendo vírus distintos (caxumba, sarampo, Dengue 1, 2 e 3 e Febre amarela) adicionado ao soro humano negativo para estes vírus. Foi então realizado um ensaio onde comparamos a quantificação do vírus febre amarela na presença e na ausência do *pool* de vírus. A variação dos Cts observada não ultrapassou 20% e quando os dados foram analisados pelo coeficiente de correlação de Pearson no programa GraphPad Prism® versão 5.01, a variação entre os resultados não apresentou diferença estatisticamente significativa, sugerindo que não houve interferência na quantificação de febre amarela, mostrando a robustez do teste (Gráfico 5.6). O controle negativo usado neste experimento obteve um resultado indeterminado, confirmando assim a não amplificação de vírus da febre amarela.



**Gráfico 5.6** – Análise comparativa dos valores de Ct para as concentrações do vírus da Febre Amarela 17DD diluído em soro humano negativo (curva padrão VFA) e em soro contendo em conjunto os vírus da Caxumba, Dengue 1, 2 e 3 e Sarampo (curva padrão VFA + pool viral). Valor de P: 0,9950, não se mostrou estatisticamente significativo pelo coeficiente de correlação de Pearson.

## 5.7. Validação

A Tabela abaixo foi emitida pelo setor de qualidade de Bio-Manguinhos, Seção de validação analítica (SEVAN), no final da validação, como demonstrativo que a validação foi bem sucedida e que todos os critérios de aceitação foram atendidos.

**Tabela 5.5.** Análise estatística realizada pelo SEVAN. S.= desvio padrão.

Nº	Parâmetros de Avaliação	Resultado						Critério de Aceitação
		Painel sorológico			Amostra clínica			
1	Repetitividade do método	S. Alto	S. médio	S. baixo	S. Alto	S. médio	S. baixo	CV < 10%
		3,35	1,72	2,84	0,62	2,14	2,74	
2	Precisão Intermediária variando dia – Operador 2	S. Alto	S. médio	S. baixo	S. Alto	S. médio	S. baixo	
		0,71	0,45	2,17	-	-	-	
3	Precisão Intermediária variando dia – Operador 1	S. Alto	S. médio	S. baixo	S. Alto	S. médio	S. baixo	
		2,28	1,31	2,22	1,07	1,57	1,98	
4	Precisão Intermediária variando analista	S. Alto	S. médio	S. baixo	S. Alto	S. médio	S. baixo	
		1,72	1,13	2,14	1,29	1,59	2,08	
5	Especificidade	Conforme						Positivo para o vírus de febre amarela Negativo para os demais vírus
6	Limite de detecção	Diluição 12,5 com o CT médio de 36,14						A determinar
7	Limite de quantificação	Diluição 100 com o CT médio 34,16						A determinar

## 5.8. Gene de Referência

Para garantir que os resultados negativos não correspondiam a uma falha em qualquer etapa do ensaio, avaliamos a presença de um gene de referência nas amostras de soro positivas e negativas para febre amarela.

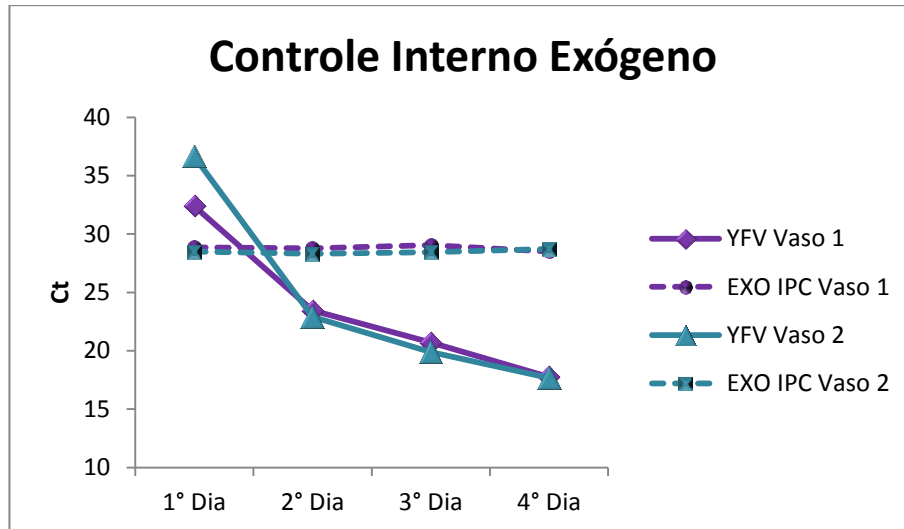
A RNase P é um gene constitutivo, presente no sangue humano e tem sido utilizado como controle endógeno. Para esta análise, utilizamos as amostras usadas na validação (vírus propagado em garrafa estacionária purificado e diluído em soro humano, amostras clínicas e várias amostras de soro negativas para febre amarela) para avaliar a detecção de RNase P como controle interno endógeno. Todas as amostras foram aplicadas em triplicatas e independente da carga de RNA para febre amarela, os valores de Ct para a RNase P se mantiveram relativamente constantes (Tabela 5.6).

**Tabela 5.6** – Valores de Ct para o alvo da RNase P e para a região NS5 do vírus febre amarela (VFA) nas amostras analisadas. Cada número (22718, 21037, 20827, 20825 e 20671) correspondem a amostras de soro individuais de pacientes vacinados, analisadas por RT-qPCR para o alvo febre amarela e RNase P, confirmando a ausência de resultados falsos-negativos.

Amostra	Ct Febre Amarela	Ct RNase P
Amostra Clínica Baixa	36,40	31,30
Amostra Clínica Média	35,84	31,41
Amostra Clínica Alta	34,95	31,93
Painel Sorológico Alto	20,96	30,43
Painel Sorológico Baixo	27,49	29,22
Vírus Reconstituído em Soro	20,80	29,99
Amostra 22718	35,25	29,99
Amostra 21037	Indeterminado	30,82
Amostra 20827	Indeterminado	31,39
Amostra 20825	Indeterminado	31,78
Amostra 20671	Indeterminado	30,12
Soro Negativo	Indeterminado	30,54

## 5.9. Controle Interno Exógeno

Com o objetivo de ter um controle interno para as amostras de vírus propagado em biorreator em meio livre de soro, foi necessário estabelecer um controle interno exógeno (EXO IPC) que garantisse a veracidade de resultados negativos. As amostras foram aplicadas em triplicatas e a análise dos dados demonstraram que independente da concentração de vírus, bem como na ausência do mesmo o EXO IPC apresentou mínima variação nos valores de Ct, sugerindo fortemente que o mesmo poderia ser utilizado como controle interno exógeno para amostras isentas de soro (Gráfico 5.7).

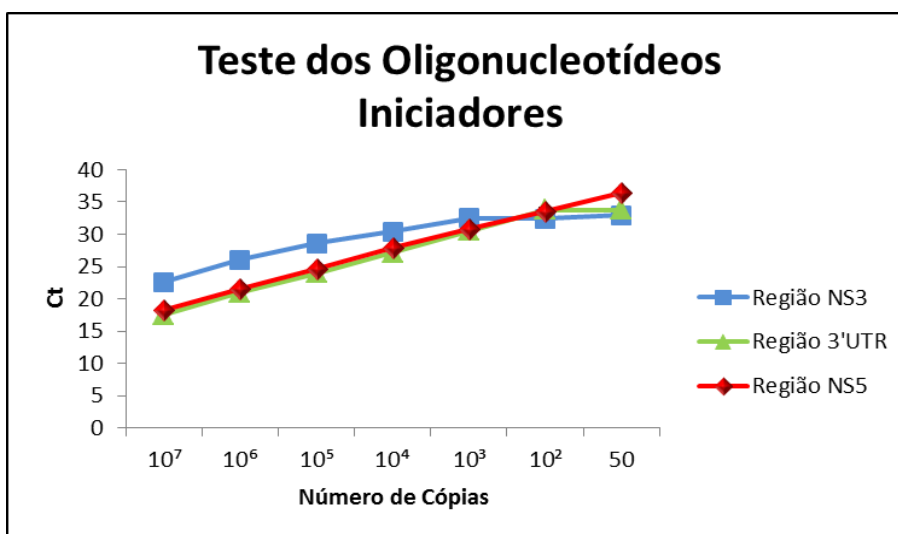


**Gráfico 5.7** – Amostras de biorreator analisadas para os alvos da região NS5 do vírus da febre amarela (VFA) e para o EXO IPC (controle exógeno). Em roxo estão representadas as amostras do vaso 1 do biorreator 6 e em verde as amostras do vaso 2 do biorreator 6. Em pontilhado está apresentado o resultado obtido para o EXO IPC, mostrando a mínima variação de detecção entre as amostras.

### 5.10. Teste dos Oligonucleotídeos Iniciadores

Como as amostras oriundas de estudos clínicos geralmente apresentam baixa carga viral para febre amarela, onde o número de cópias virais pode estar em uma faixa de concentração entre o limite de quantificação e detecção, é importante termos mais de um alvo genômico para análise, visando minimizar possíveis dúvidas na detecção dessas amostras, permitindo inclusive uma análise em ensaios de PCR multiplex para mais de um alvo do mesmo vírus. Para viabilizar esta análise, testamos diferentes iniciadores (região NS3, 3'UTR e NS5) para vírus da febre amarela empregando o sistema SYBR Green, em uma reação de etapa única (*one step*; reação de transcrição reversa simultânea à PCR). O sistema SYBR Green nos permitiu avaliar a formação de dímeros de iniciadores através das análises da curva de dissociação, e comparar o desempenho dos mesmos na detecção viral. Os dados revelaram que apesar da pequena variação na detecção do vírus pelos diferentes iniciadores a região NS3 apresentou uma linearidade menor em relação à detecção

das demais regiões virais, e a região 3'UTR alcançou um *plateau* na quantificação de concentrações menores, inviabilizando a diferenciação entre concentrações virais abaixo de 100 cópias/reação (Gráfico 5.8).



**Gráfico 5.8** – Análise do desempenho dos iniciadores para as regiões NS3, 3'UTR e NS5 do vírus da febre amarela, empregando o sistema SYBR Green de RT-qPCR. A região NS3 apresentou baixa linearidade e a região 3'UTR não permitiu diferenciar entre as concentrações virais mais baixas (100 e 50 cópias/reação).

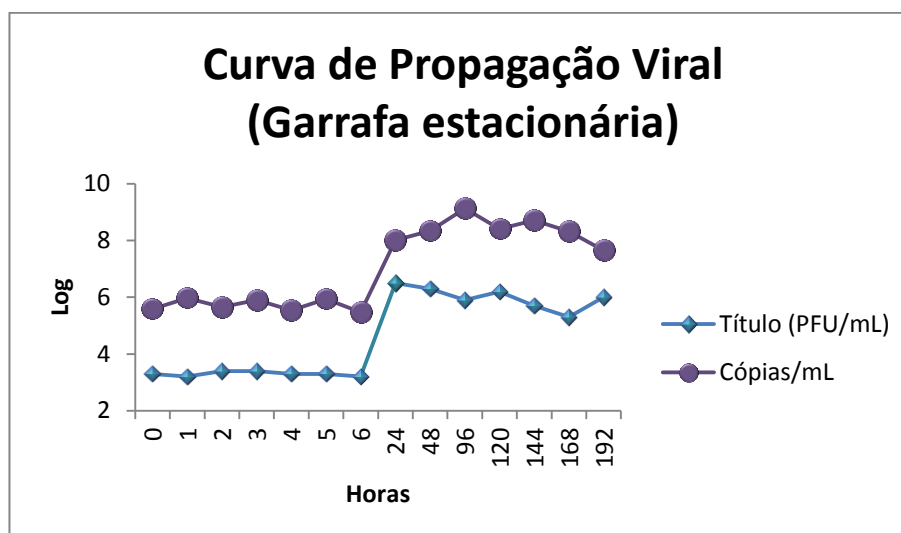
## 5.11. Correlação entre os ensaios de quantificação por PFU/mL e Cópias/mL

### 5.11.1. Curva de propagação viral em garrafa estacionária

Uma das etapas do processo de desenvolvimento de uma vacina viral é a determinação da cinética de propagação viral. Esta cinética permite avaliar o pico de produção do antígeno. No LATEV estas cinéticas são realizadas com três abordagens distintas: em garrafas estacionárias, em biorreatores e em *cell factories*. O PCR em Tempo Real permitiu a análise dessas cinéticas, através da quantificação do RNA viral e uma posterior comparação com os ensaios de titulação por placas de lise. Na curva de propagação viral em garrafa estacionária, onde o vírus propagado foi quantificado por ensaio de placa de lise e por RT-qPCR, alíquotas foram retiradas de hora em hora nas primeiras 6 horas e em seguida, de 24 em 24 horas. O resultado foi analisado e demonstrou um perfil similar nas duas técnicas de



quantificação (Gráfico 5.9). Com o objetivo de verificar se há uma correlação entre os dois métodos de quantificação, calculamos a razão entre os dois ensaios para todos os pontos avaliados (Tabela 5.7) e obtivemos uma média de 1,58 (IC<sub>95%</sub>: 1,47 - 1,68) (Tabela 5.5).



**Gráfico 5.9** – Análise da cinética de propagação viral em garrafa estacionária. As amostras foram quantificadas por ensaio de placa de lise (PFU/mL, em azul) e por PCR em tempo real (cópias/mL, em roxo). Nota-se que as curvas apresentam um perfil semelhante.

**Tabela 5.7.** Cinética de propagação viral em garrafa estacionária.

Horas de infecção	Título (PFU/mL)*	Cópias (RNA/mL)*	Razão (RNA/mL/PFU/mL)	Diferença RNA/mL/PFU/mL	
0	3,3	5,5	1,67	2,2	
1	3,2	5,9	1,84	2,7	
2	3,4	5,6	1,65	2,2	
3	3,4	5,9	1,74	2,5	
4	3,3	5,5	1,67	2,2	
5	3,3	5,9	1,79	2,6	
6	3,2	5,4	1,69	2,2	
24	6,5	8,0	1,23	1,5	
48	6,3	8,3	1,32	2,0	
96	5,9	9,1	1,54	3,2	
120	6,2	8,4	1,35	2,2	
144	5,7	8,7	1,53	3	
168	5,3	8,3	1,57	3	<b>Média 1,58</b>
192	6,0	7,6	1,27	1,6	<b>IC<sub>95%</sub> : 1,47 - 1,68</b>

\*valores expressos em log<sub>10</sub>.

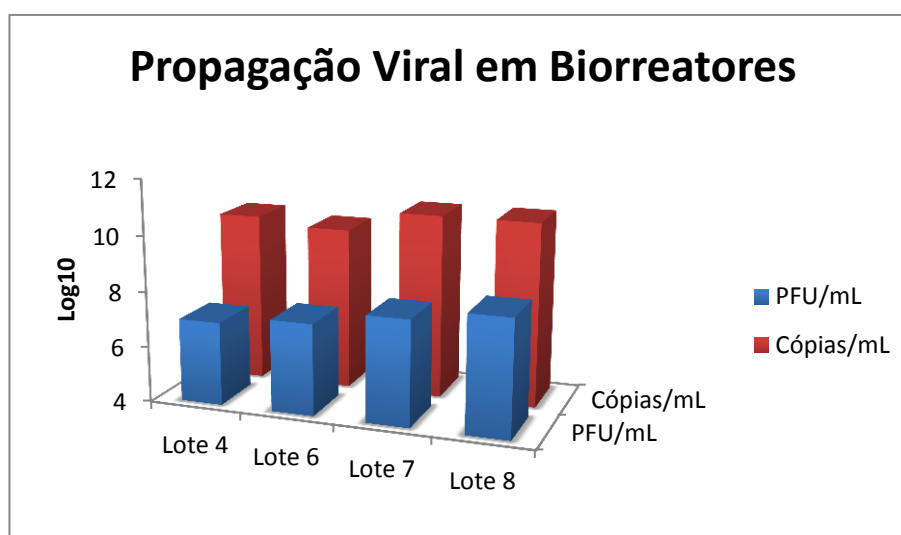
### 5.11.2. Cinética de propagação viral em biorreatores.

Para a cinética de propagação viral em biorreatores, as amostras do dia da coleta, referente ao 4º dia após a inoculação, de quatro lotes diferentes (ou seja, quatro biorreatores diferentes), previamente quantificadas pelo ensaio da placa de lise, também foram quantificadas por RT-qPCR (Gráfico 5.10). Ao analisar o resultado, observamos que para cada método, a quantidade de vírus obtida no quarto dia após a inoculação para os diferentes lotes de propagação foi muito similar (Tabela 5.6). Ao analisarmos a razão entre os títulos calculados por PFU/mL e o número de cópias de RNA para todos os lotes produzidos obtivemos uma média de 1,36 (IC<sub>95%</sub>: 1,30 - 1,41) (Tabela 5.8) e (Gráfico 5.10).

**Tabela 5.8.** Cinética de propagação viral em biorreatores.

	<b>Cópias (RNA/mL)*</b>	<b>Título (PFU/mL)*</b>	<b>Razão (RNA/mL/PFU/mL)</b>	<b>Diferença (RNA/mL/PFU/mL)</b>	
<b>Lote 4</b>	10,11	7,0	<b>1,44</b>	<b>3,11</b>	
<b>Lote 6</b>	9,85	7,3	<b>1,35</b>	<b>2,55</b>	
<b>Lote 7</b>	10,61	7,8	<b>1,36</b>	<b>2,81</b>	<b>Média 1,36</b>
<b>Lote 8</b>	10,61	8,2	<b>1,29</b>	<b>2,41</b>	<b>IC<sub>95%</sub> 1,30 - 1,41</b>

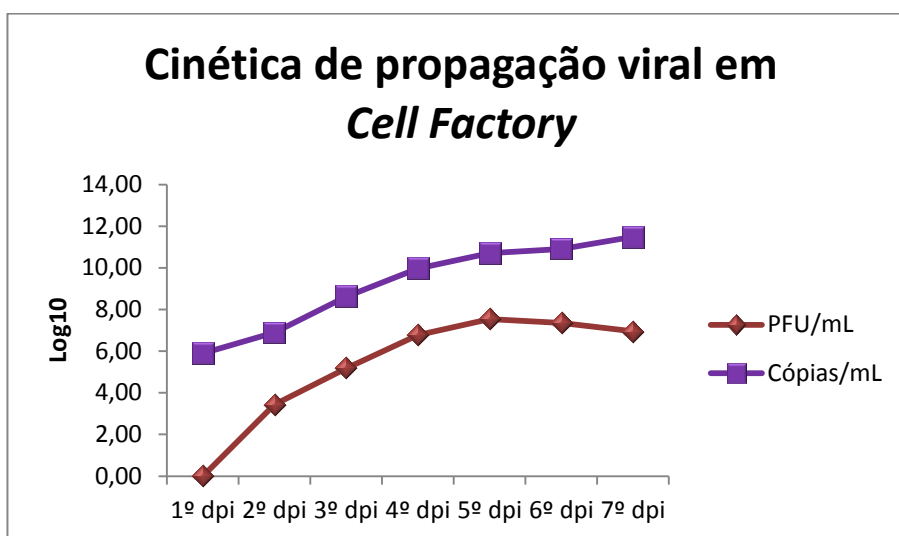
\*valores expressos em log10.



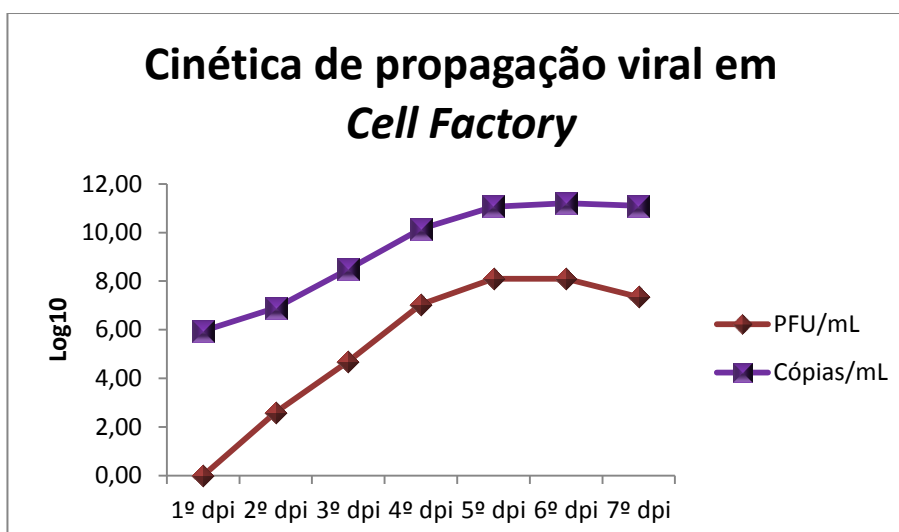
**Gráfico 5.10** – Análise da propagação viral em biorreatores referente ao 4º dia após a inoculação. Em vermelho, está demonstrado o resultado obtido pela quantificação por RT-qPCR (cópias/mL). Em azul, o resultado obtido na titulação por placa de lise (PFU/mL).

### 5.11.3. Cinética de propagação viral em *Cell Factory*.

Para a cinética de propagação viral em *Cell Factory*, analisamos as amostras de duas cinéticas durante sete dias após a infecção, quantificadas pelo ensaio da placa de lise, e também por RT-qPCR (Gráficos 5.11 e 5.12). Ao analisar o resultado, observamos que o perfil das curvas para as diferentes cinéticas de propagação foi muito similar. Quando calculamos a razão entre os títulos obtidos por PFU/mL (placa de lise) e o número de cópias de RNA (RT-qPCR) nas duas cinéticas obtivemos uma média de 1,65 (IC<sub>95%</sub>: 1,44 - 1,85) em ambas as situações (Tabelas 5.9).



**Gráfico 5.11** – Cinética 1 da curva de propagação viral em *Cell Factory*. As amostras foram quantificadas por RT-qPCR (cópias/mL, em roxo) e por ensaio de placa de lise (PFU/mL, em marrom). dpi = dias pós-infecção.



**Gráfico 5.12** – Cinética 2 da curva de propagação viral em *Cell Factory*. As amostras foram quantificadas por RT-qPCR (cópias/mL, em roxo) e por ensaio de placa de lise (PFU/mL, em marrom). dpi = dias pós-infecção.

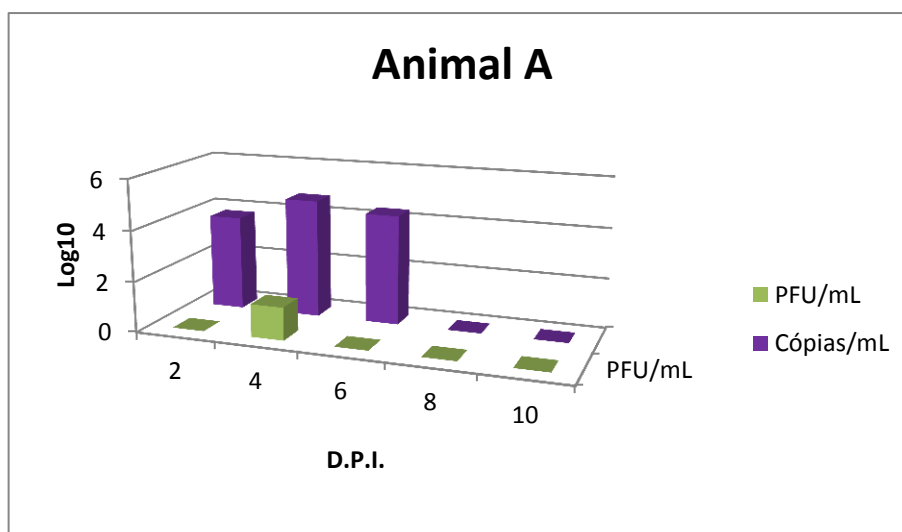
**Tabela 5.9.** Cinética 1 e 2 da curva de propagação viral em *Cell Factory*.

	Cinética 1				Cinética 2			
	PFU/mL*	Cópias/mL*	Razão	Diferença	PFU/mL*	Cópias/mL*	Razão	Diferença
1º dpi	-	5,95	-	-	-	5,9	-	-
2º dpi	2,6	6,89	2,65	4,29	3,43	6,89	2,01	3,46
3º dpi	4,69	8,49	1,81	3,80	5,18	8,62	1,67	3,44
4º dpi	7,04	10,15	1,44	3,11	6,78	9,98	1,47	3,20
5º dpi	8,1	11,06	1,37	2,96	7,54	10,71	1,42	3,17
6º dpi	8,1	11,21	1,38	3,11	7,36	10,91	1,48	3,55
7º dpi	7,35	11,1	1,51	3,75	6,95	11,48	1,65	4,53
Média	1,65							
IC <sub>95%</sub>	1,44 - 1,85							

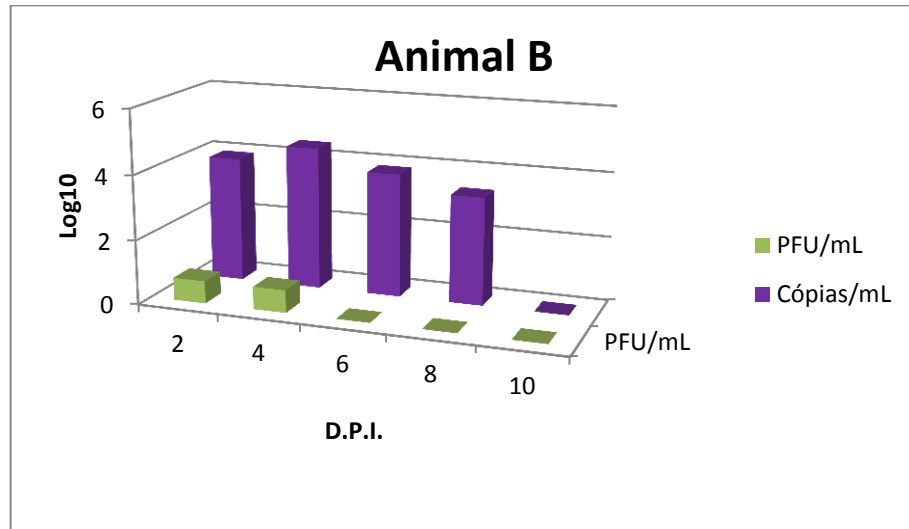
\*valores expressos em log10.

#### 5.11.4. Amostras de soro de primatas não humanos

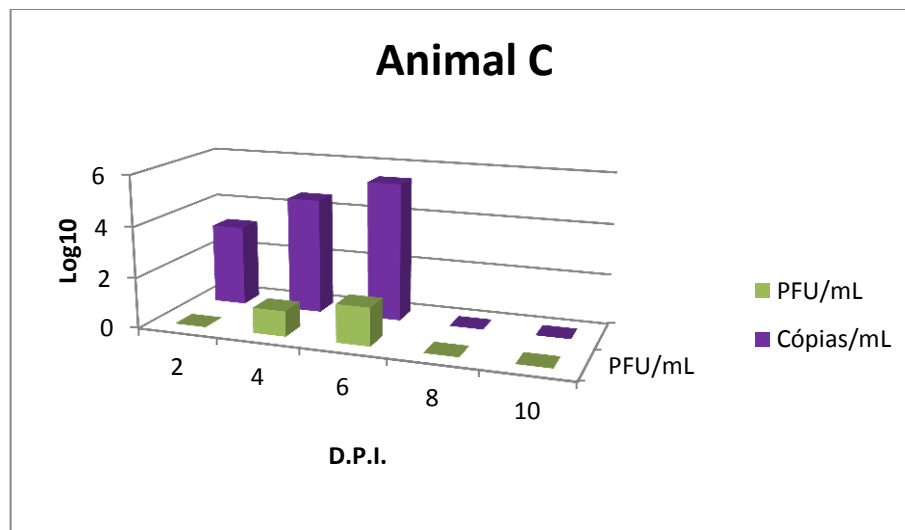
Para cada animal, observamos variações na estimativa da carga viral entre os dois métodos de quantificação (Gráficos 5.13 a 5.16). Podemos confirmar também a maior sensibilidade da PCR em tempo real quando comparada ao ensaio de placa de lise, onde o ensaio de quantificação molecular permitiu confirmar a presença do vírus em 4 de 11 (36,4 %) amostras que foram negativas pela titulação por ensaio de placa de lise (Tabela 5.10).



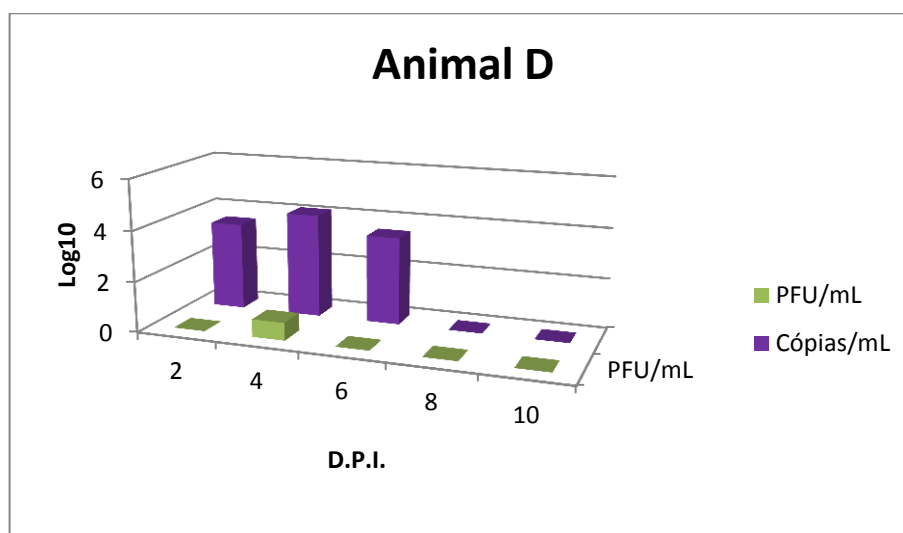
**Gráfico 5.13** – Avaliação da carga viral referente ao animal A. As amostras foram quantificadas por RT-qPCR (cópias/mL, em roxo) e por ensaio de placa de lise (PFU/mL, em verde). dpi = dias pós-imunização.



**Gráfico 5.14** – Avaliação da carga viral referente ao animal B. As amostras foram quantificadas por RT-qPCR (cópias/mL, em roxo) e por ensaio de placa de lise (PFU/mL, em verde). dpi = dias pós-imunização.



**Gráfico 5.15** – Avaliação da carga viral referente ao animal C. As amostras foram quantificadas por RT-qPCR (cópias/mL, em roxo) e por ensaio de placa de lise (PFU/mL, em verde). dpi = dias pós-imunização.



**Gráfico 5.16** – Avaliação da carga viral referente ao animal D. As amostras foram quantificadas por RT-qPCR (cópias/mL, em roxo) e por ensaio de placa de lise (PFU/mL, em verde). dpi = dias pós-imunização.

**Tabela 5.10.** Estimativa da carga viral dos animais vacinados com a vacina 17DD para o vírus da febre amarela empregando ensaios de placa de lise (PFU/mL) e RT-qPCR (cópias/mL).

	Animal A		Animal B		Animal C		Animal D	
Dia	PFU/mL*	Cópias/mL*	PFU/mL*	Cópias/mL*	PFU/mL*	Cópias/mL*	PFU/mL*	Cópias/mL*
2	0	3,78	0,7	3,91	0	3,21	0	3,50
4	1,3	4,71	0,7	4,44	1	4,58	0,7	4,13
6	0	4,36	0	3,84	1,5	5,46	0	3,49
8	0	0,00	0	3,35	0	0,00	0	0,00
10	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00

\*valores expressos em log<sub>10</sub>.

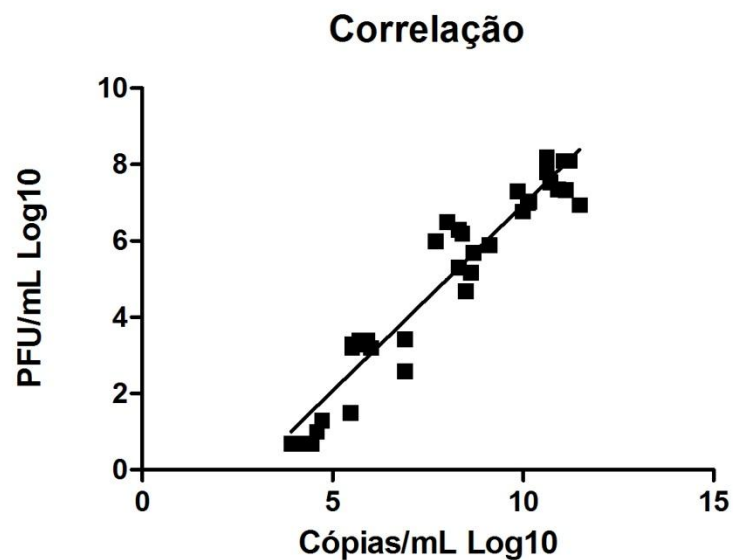
#### 5.11.5. Análise estatística

Quando compilamos os resultados apresentados anteriormente (Tópicos 5.11.1 a 5.11.4) de PFU/mL Log<sub>10</sub> e Cópias/mL Log<sub>10</sub>, e analisamos estatisticamente no programa GraphPad Prism® versão 5.01 usando um teste paramétrico de correlação (Gráfico 5.17), obtivemos um valor de R de 0,96 (com um intervalo de confiança de 0,92 a 0,98). Através da regressão linear obtivemos

um *slope* de 0,974 e *interceptor* de 2,807. Com esses dados podemos, com a equação da reta, estimar o valor em PFU/mL a partir de um resultado em cópias/mL.

Logo:

$$\text{Log}_{10} \text{ PFU/mL} = 0,974 \pm 0,049 \text{ Log}_{10} \text{ cópias/mL} - 2,807$$



**Gráfico 5.17** – Análise estatística do valor obtido em todas as amostras analisadas no tópico 5.11, com o vírus febre amarela 17DD em PFU/mL Log<sub>10</sub> e seu correspondente em Cópias/mL Log<sub>10</sub>.

## 6. Discussão

### 6.1. Validação da metodologia de RT-qPCR para o vírus da febre amarela

Quando se objetiva padronizar a quantificação absoluta, o material de referência deve ser o mais similar possível do material analisado (Mantel e cols. 2008). Para a validação da metodologia molecular, foi necessária a confecção de uma curva padrão plasmidial, pois a titulação viral adotada anteriormente que correlaciona PFU/mL não correspondeu ao valor real estimado através da quantificação de cópias de RNA. Os valores gerados por ambos os ensaios foram analisados estatisticamente pelo coeficiente de correlação de Pearson, confirmando a diferença significativa com valor de  $P < 0.0001$ . Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que nem todas as partículas virais serem infecciosas, considerando que algumas podem estar defeituosas ou imaturas (Mantel e cols., 2008), assim como a resposta do sistema imune e partículas inativadas, não permitindo a formação do placa de lise, mas ainda assim vão apresentar RNA viral que será quantificado pela qPCR.

O primeiro passo foi testar diferentes concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores e sonda, para encontrar a faixa de concentração ótima para esses reagentes e a melhor proporção entre eles, seguindo um modelo de custo-benefício. Nesses experimentos foram selecionadas as concentrações que apresentavam melhor eficiência de quantificação, ou seja, que teria a menor variação entre as replicatas e a quantificação mais acurada da amostra analisada. A faixa de 300 nanomolar de oligonucleotídeos, senso e antisenso, e 125 nanomolar para a sonda TaqMan foi estabelecida para todos os experimentos da validação, pois essas concentrações apresentaram o menor Ct dentre as analisadas com a menor variação de Cts entre as réplicas.

A padronização e validação da PCR em tempo real foi extremamente necessária, pois essa ferramenta pode ser usada em todos os processos da produção de vacinas, desde a produção dos antígenos, onde através da PCR em tempo real pode-se monitorar a propagação do vírus, fornecendo assim o melhor momento para interrupção e coleta do vírus *in vitro*. Também pode ser usada para avaliar os lotes vacinais, para avaliar a potencial viral assim como avaliar amostras clínicas em



estudos dose resposta vacinal e carga viral em casos de reações adversas quando ocorrerem. Diferentemente do ensaio de placa de lise que consome muito tempo (7-10 dias) a RT-qPCR tem o acompanhamento em tempo real da quantidade de RNA/DNA viral produzido, permitindo assim um resultado eficaz muito mais rápido que o ensaio tradicional, possibilitando uma ação rápida nos casos acima citados.

### **6.1.1. Avaliando a linearidade.**

Em experimentos de linearidade é necessário que amostras de concentrações conhecidas ou diluições seriadas de concentrações conhecidas sejam usadas. Para estabelecer um intervalo linear para testes desenvolvidos em laboratórios, a CLSI (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais) recomenda o uso de 7 a 11 concentrações através da escala de medida esperada. As amostras devem ser testadas em repetições de 2-4 ensaios, dependendo da imprecisão esperada para o ensaio (Burd, 2010).

Nos experimentos que avaliamos a linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, foram usadas 13 diluições seriadas (as seis primeiras –  $10^7$  a  $10^2$  diluídas na base 10 e as restantes na base 2 até a concentração de 1,5 cópias/reação ) em oito réplicas, onde houve a detecção do RNA viral em 9 concentrações, de  $10^7$  até 12,5 cópias/reação, corroborando assim com os achados de Mantel e cols., 2008 , onde o vírus foi detectado até 12 cópias/reação. O  $R^2=0,997$  encontrado para a curva padrão formada pelos pontos  $10^7$  até  $10^2$  confirma a linearidade neste intervalo. Esse intervalo pode ser considerado como a faixa reportável do nosso ensaio. Para concentrações acima de  $10^7$  cópias temos ainda uma boa linearidade nos pontos  $10^8$  e  $10^9$  que podem ser incorporados como parte da faixa linear do teste, porém para valores abaixo de  $10^2$  cópias/reação, a curva alcança um *plateau* que nos leva a acreditar que não esteja ocorrendo uma real discriminação entre as diluições maiores.

### **6.1.2. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).**

Devido à variação dos resultados nas menores concentrações, o limite de quantificação foi estabelecido no valor de 100 cópias, pois até essa faixa podemos formar uma curva linear que significa uma quantificação mais fidedigna e com menor variação entre as réplicas. A partir desta concentração, a curva atinge um patamar onde ocorre a estagnação da quantificação, não diferenciando assim entre cargas virais mais baixas, mas possibilitando ainda a detecção do RNA viral.

Para o limite de detecção, foi selecionada a menor concentração que apresentou a detecção de pelo menos 50 % entre as oito réplicas, que foi de 25 cópias/reação ou 2147 cópias/mL; apesar do laudo gerado pela qualidade ter definido o valor de 12,5 cópias/reação como o limite de detecção, pois foi considerado que o número mínimo de réplicas para definição de parâmetros eram 6 réplicas e a diluição com 12,5 cópias apresentou 3 réplicas detectadas. Mantel e cols. (2008) definiram a detecção viral até 12 cópias/reação, entretanto o nosso grupo adotou o valor de 25 cópias/reação para dar uma margem de segurança e maior confiabilidade nos laudos gerados. No nosso estudo, esta concentração não forneceu uma quantificação precisa, ao contrário, ocorreu uma grande variação entre as réplicas, porém possibilitou a detecção viral. Normalmente, o limite de detecção está abaixo da faixa de linearidade de um ensaio e é menor que o limite de quantificação. O limite de detecção não pode ser maior que o de quantificação (Burd, 2010).

### **6.1.3. Avaliando a Precisão Intermediária**

Os experimentos que avaliaram a precisão intermediária para a RT-qPCR em tempo real demonstraram que o teste apresentou excelente repetibilidade e reprodutibilidade. Isso significa que apesar da variação de operadores, pois diferenças na aplicação da técnica entre operadores individuais, podem também introduzir considerável distorção (Burd, 2010), e da variação dos dias em que as amostras foram analisadas, os resultados dos ensaios foram homogêneos, com pequenas variações nos valores de Cts. É importante ressaltar que os testes empregando diferentes operadores foram realizados desde a etapa inicial, ou seja

incluindo o processamento das amostras para recuperação do RNA viral a ser analisado, fator que poderia aumentar ainda mais o erro entre os resultados obtidos. Entretanto ainda assim foi pequena a variação entre os resultados.

Quando analisados graficamente os dados obtidos do painel sorológico, nota-se pequena variação entre os resultados obtidos nos diferentes dias, assim como entre os dois operadores. Nos experimentos com amostras clínicas, também ocorreu pequena variação entre os operadores e entre ensaios nos dias diferentes. Essas amostras apresentavam uma baixa carga viral, na maioria das vezes, muito próxima ao limite de detecção estabelecido, mas mesmo assim o teste se mostrou sensível e com pouca discordância entre os resultados. O critério de aceitação, que não deveria passar de 20 %, não só foi respeitado como vimos que a maior variação encontrada foi de 3,35 %, valor muito inferior ao estabelecido. Por esse motivo, decidimos alterar o critério de aceitação para 10 %, não só para essa como para futuras validações em RT-qPCR.

Comparado com os resultados descritos por Shang e cols. (2012), onde foi validado um ensaio de PCR em tempo real com o sistema SYBR Green para o vírus da hepatite delta, os autores obtiveram 1,19 % de variação entre o mesmo operador, um resultado que mostrou menor variação do que o obtido neste estudo (3,35 %). Porém, a metodologia de Shang e cols. (2012) consistiu em 5 replicatas de cada ponto da curva padrão em um único ensaio, tornando assim, diferente a forma de avaliação da repetitividade. Em relação à reprodutibilidade do método desenvolvido pelo grupo de Shang, foram avaliados os resultados obtidos por três operadores diferentes, empregando apenas duas concentrações do vírus da hepatite delta (alta concentração viral –  $10^5$  e baixa concentração viral –  $10^2$ ). O coeficiente de variação obtido foi de até 2,87 %, enquanto em nossos experimentos foi feita uma avaliação mais completa destes parâmetros, onde dois operadores distintos avaliaram três concentrações diferentes do vírus da febre amarela, em dois tipos de amostras (amostras clínicas e painel sorológico), e encontramos um coeficiente de variação entre os operadores de até 2,14 %.

A variação encontrada em nosso grupo para a região NS5 do vírus da febre amarela pode ser considerada pequena, quando comparada com a encontrada por Bae e cols. (2003), onde foi descrita a quantificação através da PCR em tempo real pelo sistema TaqMan para as regiões NS3 e 3'UTR do vírus da febre amarela. Para

o alvo NS3, a variação encontrada nos ensaios de reprodutibilidade foi de 16 % e de 12% para a região 3' UTR. Em relação à repetibilidade, a variação entre os ensaios foi de 16 % (para a região NS3) e 10 % (para a região 3'UTR), o que confirma a maior precisão de nossos resultados.

De acordo com Sloan (2007), o FDA recomenda três replicatas em duas concentrações distintas em experimentos realizados no mesmo dia e em dias diferentes. Logo, o teste desenvolvido no presente estudo não só está de acordo com os parâmetros de qualidade estabelecidos por Bio-Manguinhos, como também se mostra adequado às exigências do FDA. É importante avaliar a precisão intermediária de um método, pois demonstra que independente do operador ou do dia em que o ensaio foi realizado, o resultado para uma mesma amostra apresenta uma variação mínima, podendo assim gerar laudos confiáveis no caso de amostras clínicas vacinais, principalmente quando relacionadas a reações adversas.

#### **6.1.4. Avaliando especificidade**

Nos ensaios de avaliação da especificidade, foi comprovado que os oligonucleotídeos iniciadores e a sonda usada são altamente específicos, não ocorrendo nenhuma resposta cruzada com nenhum outro vírus dentre os avaliados (Dengue 1, 2 e 3 e Encefalite Japonesa - VEJ). Esses resultados corroboram os achados de Mantel (2008), artigo pioneiro que descreve as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e sonda, adotados nos experimentos de validação. No trabalho de Gurukumar e cols. (2009), experimentos similares foram usados para comprovar a especificidade da PCR em tempo real para o vírus da dengue, onde foram usados também dois flavivírus (vírus da encefalite japonesa e o vírus chikungunya), obtendo 100 % de especificidade.

É importante, principalmente no caso de quantificação de carga viral em amostras clínicas, que tal especificidade exista para garantir que a carga viral encontrada corresponda apenas ao vírus da febre amarela, no caso de pacientes co-infectados ou mesmo apresentando infecção por outros flavivírus, sobretudo pelo vírus da dengue, devido à grande ocorrência desta enfermidade no estado do Rio de

Janeiro, com grande chance da amostra a ser diagnosticada apresentar a presença de ambos os vírus.

No parecer emitido pelo SEVAN/Bio-Manguinhos, os resultados foram considerados dentro da conformidade para atender os parâmetros estabelecidos para a validação. Porém, como alguns autores (Burd, 2010 e Sloan, 2007) ressaltam a importância de analisar a especificidade analítica do teste, além de ser uma das exigências do FDA, ensaios para especificidade analítica foram realizados a fim de aumentar a confiabilidade do método e mostrar que, independente da presença de outros vírus nas amostras analisadas, estes, pouco interferiram no resultado encontrado. A maior variação encontrada foi menor que 20 %, quando as duas curvas referentes à presença exclusiva do vírus febre amarela 17DD no soro e à presença conjunta dos vírus da caxumba, dengue (1, 2 e 3), sarampo e febre amarela no soro humano, foram analisadas estatisticamente pelo coeficiente de correlação de Pearson. Foi confirmada que a diferença encontrada na quantificação de ambos os painéis de amostras não foi significativa ( $p = 0,9950$ ), aumentando assim a confiabilidade dos laudos em casos de co-infecções do paciente. Ressalta-se que nestes ensaios, ambas as curvas padrão foram diluídas serialmente e cada diluição foi processada independentemente para recuperação do material genético a ser dosado, o que pode ter influenciado no aumento da variação entre as curvas geradas por cada painel analisado.

Concomitante aos experimentos de especificidade foi usada a ferramenta BLAST para comparar as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e sonda TaqMan no banco de dados genômicos, a fim de confirmar a ausência de homologia entre as sequências dos vírus analisados, comprovando que, não há via reação cruzada entre eles.

## **6.2. Gene de referência**

Gene de referência ou controle endógeno é um elemento importante da PCR em tempo real porque a sua amplificação é essencial para verificar a qualidade e a quantidade de ácido nucléico em todo o processo de diagnóstico. Em nossos ensaios utilizando o gene humano RNase P H1, presente em duas cópias no genoma diplóide e que foi fornecido na forma de kit comercial.

Observamos que, houve pouca variação dos valores de Ct entre as amostras avaliadas, apesar da grande diferença entre as cargas virais apresentadas por cada amostra, confirmando que a RNase P foi uma boa escolha como gene de referência para nossos ensaios de quantificação. Para todas as amostras avaliadas, os valores de Ct foram consistentes, sendo incluídos na faixa aceitável de  $Ct = 30 \pm 1$ . Através desta análise, podemos afirmar que não houve nenhum resultado falso negativo em relação à detecção/quantificação do vírus da febre amarela, e atestar a veracidade dos resultados obtidos em todos os experimentos.

## **6.3. Controle interno exógeno**

O controle interno exógeno foi usado para as amostras provenientes do biorreator, devido a impossibilidade de usar a RNase P como controle interno da reação, pois o vírus foi propagado em meio livre de soro, e o gene da RNase P é um gene constitutivo do genoma humano presente no sangue. Os nossos resultados foram consistentes, em todas as situações, o Ct do controle exógeno se manteve bem próximo da média ( $Ct = 28,64$ ). Foi estabelecido que as amostras que tivessem uma variação maior que  $\pm 1Ct$  deveriam ser analisadas novamente, pois invalidaria o resultado. Em 2012, Shulman e cols. descreveram os parâmetros estabelecidos para análise de IPC em amostras de fezes e estabeleceram uma variação de 3 Cts para amostras positivas e de até 6 Cts para amostras negativas. Esta diferença encontrada entre os resultados de Shulman e cols., 2012, e os valores encontrados no teste padronizado no LATEV podem ser explicados pela diferença entre a origem

das amostras analisadas, pois nas fezes são encontrados muitos inibidores que podem interferir na maior variabilidade entre os resultados.

Nos ensaios de propagação viral em bioreatores, a variação dos valores de Ct para EXO-IPC foi muito pequena entre as amostras analisadas, tornando-o assim um bom controle interno para verificar a eficácia das etapas da reação de RT-qPCR.

#### **6.4. Análise Comparativa dos oligonucleotídeos iniciadores**

Para comparar os oligonucleotídeos iniciadores usados na validação, a fim de saber se outra região do vírus da febre amarela teria um resultado melhor ou poderia ser usado em multiplex, em caso de amostras limítrofes para confirmação de diagnóstico, Oligonucleotídeos desenhados para outras regiões do genoma viral foram avaliados e suas performances comparadas.

Os oligonucleotídeos usados para as regiões 3' UTR e NS3 foram descritos e avaliados previamente pelo sistema TaqMan, apresentando um desempenho satisfatório (Bae e cols. 2003). Porém, no nosso estudo ao serem comparados com os oligonucleotídeos iniciadores para a região NS5, descritos previamente por Mantel e cols. (2008) e usados na nossa validação, apresentaram alta formação de dímeros, não detectada pelo sistema Taqman, porém bem evidente no sistema SYBR® Green, através da análise da curva de dissociação dos produtos gerados.

A região NS3 apresentou um desempenho menor quando comparada as regiões NS5 e 3' UTR. Quando este resultado é analisado graficamente observou-se uma linearidade abaixo da encontrada na quantificação pela região NS5 e um rápido alcance da estagnação da curva, tornando o limite de quantificação para a região NS3 pelo menos 10 vezes maior que o estimado para a região NS5.

A região 3' UTR apresentou uma menor sensibilidade em amostras mais diluídas, isto é, com cargas virais baixas, alcançando um *plateau* antes do observado para a região NS5, indicando assim que o limite de detecção para o alvo 3' UTR seria maior que o da região NS5. Considerando que na faixa de concentração entre  $10^2$  a 50 cópias RNA/mL - intervalo onde a curva de quantificação do alvo 3' UTR deixou de ser linear, está situada a maior parte das amostras clínicas analisadas,

consideramos que a região 3' UTR não atende aos pré-requisitos necessários para confirmação de diagnóstico para o vírus da febre amarela.

Ressalta-se que a diferença encontrada entre os resultados do presente estudo e aqueles encontrados por Bae e cols. (2003) possa ser explicada pelo uso de dois sistemas de quantificação diferentes. No nosso caso, os novos alvos testados foram usados em SYBR Green, enquanto no trabalho original de Bae e cols. (2003), o sistema avaliado foi com o uso de sonda TaqMan.

## **6.5. Correlação entre PFU/mL e Cópias/mL**

### **6.5.1. Curva de propagação viral em garrafa estacionária**

Ao analisar graficamente a curva de propagação viral em garrafa estacionária, nota-se um perfil de cinética semelhante entre as curvas quantificadas por RT-qPCR e por ensaio de placa de lise, o que permite sugerir que a medida em número de cópias do RNA viral, assim como a titulação de partículas infecciosas do vírus seguem um perfil de crescimento proporcional. A similaridade entre estes perfis é algo muito positivo, pois pode possibilitar a adoção do PCR em tempo real como uma ferramenta para determinação rápida do melhor momento de interromper uma produção viral, ao invés do ensaio de placa de lise que demanda 7-10 dias.

Com o objetivo de verificar se há uma correlação entre os dois métodos de quantificação, calculamos a razão entre as medidas e obtivemos uma média de 1,58, e um intervalo de confiança de 95 % (IC<sub>95%</sub>) de 1,47 - 1,68. O intervalo de confiança demonstra a pequena variação entre a razão do número de cópias e o título viral, indicando ser uma razão que se mantém constante, podendo no futuro se determinar um valor de correlação para este tipo de propagação viral.

Nota-se que em todos os momentos avaliados, o número de cópias de RNA se manteve superior ao número de partículas infecciosas, porém este resultado já era esperado e pode ser explicado pelo fato de que nem todas as partículas virais são



infecciosas, considerando que algumas estão danificadas ou imaturas corroborando com Mantel e cols., 2008.

### **6.5.2. Curva de propagação viral em biorreator**

A cinética da propagação viral em biorreator foi analisada simultaneamente por PCR em tempo real e ensaio de placa de lise. Quando as amostras foram comparadas, foi observada uma pequena variação entre a razão da quantificação pelo ensaio de RT-qPCR e por placa de lise. Ao analisar estes dados (Tabela 5.6), obtivemos uma média de 1,36 entre a razão das medidas estimadas por placa de lise e por RT-qPCR e IC<sub>95%</sub>: 1,30 - 1,41, o que demonstra que essa razão se mantém praticamente constante entre os pontos. Porém, como o número de amostras oriundas de biorreatores foi pequena (apenas 4), este *n* futuramente deverá ser ampliado para uma análise mais completa.

### **6.5.3. Curva de propagação viral em *Cell Factory***

Para a cinética de propagação viral em *Cell Factory*, analisamos as amostras de duas cinéticas durante sete dias após a infecção, quantificadas pelo ensaio da placa de lise, e também por RT-qPCR. Ao analisar os resultados, observamos que o perfil das curvas de placa de lise e de cópias RNA/mL para as diferentes cinéticas de propagação foi muito similar, corroborando com os resultados obtidos pela cinética da curva de propagação viral em garrafa estacionária.

De acordo com Bae e cols. (2003), devido a PCR em tempo real apenas detectar o material genético e não detectar a partícula infecciosa, a PCR por si só não poderia vir a substituir o ensaio de placa de lise. Porém, nossos achados indicam que calculando um fator de conversão, a PCR em tempo real poderia ser usada como ferramenta tão eficaz quanto o ensaio de placa de lise para o monitoramento da cinética de propagação viral.

#### 6.5.4. Amostras clínicas de primatas não humanos

A baixa viremia observada em nossos resultados já era esperada, e também foi descrita por Marchevsky e cols. (2003) para o período de 2 a 6 dias após a infecção. Da mesma forma, a média da carga viral encontrada em nosso grupo foi de 4,01 Log<sub>10</sub> cópias/mL, corroborando com os dados de Trindade e cols. (2008), onde foi observada uma média da carga viral de 3,29 Log<sub>10</sub> cópias/mL.

Para os diferentes animais analisados, podemos confirmar a maior sensibilidade da PCR em tempo real quando comparada ao ensaio de placa de lise, onde observamos que a carga viral muitas vezes não foi detectada por placa de lise, porém a PCR em tempo real permitiu confirmar a presença do vírus nas amostras. Também podemos perceber que onde ocorre o pico da viremia por PFU/ml, também pode ser observado um pico na quantificação em cópias/mL, seguindo um perfil similar entre os dois métodos de quantificação viral.

Após a análise estatística de todos os resultados obtidos, podemos afirmar que há uma boa correlação linear entre os resultados de PFU/mL Log<sub>10</sub> e em Cópias/mL Log<sub>10</sub>. O fator de correlação encontrado possibilita a utilização da ferramenta molecular no acompanhamento das cinéticas *in vitro* e *in vivo* de amostras de febre amarela. Podendo inclusive, futuramente ser adotada como padrão ouro nas análises laboratoriais.

## 7. Conclusões

- A análise dos resultados demonstrou que os experimentos para validação da metodologia de RT-qPCR atendem a todos os parâmetros definidos pelo setor de qualidade de Bio-Manguinhos.
- A técnica de PCR em tempo real se mostrou eficiente para determinação da carga viral do vírus da febre amarela, tanto em amostra *in vivo* quanto *in vitro*, tornando-se assim uma ferramenta muito importante para ser aplicada em todos os projetos desenvolvidos no LATEV.
- Confirmamos a existência de uma correlação confiável entre PFU/mL e Cópias/mL, porém mais ensaios ainda precisam ser realizados com um *n* amostral maior para podemos confirmar o fator de correlação encontrado entre ambos os ensaios.
- O teste de RT-qPCR para o alvo NS5 do vírus da febre amarela se mostrou altamente específico, não permitindo a detecção de outros flavivírus testados.
- Para uma quantificação mais precisa, o ideal é a utilização de uma curva padrão plasmidial ao invés de uma estimada por placa de lise.
- A RNase P se mostrou como excelente gene de referência para ser usado como controle interno endógeno em amostras clínicas.
- O EXO-IPC também se comportou como excelente controle interno exógeno para ser usado em amostras de vírus propagados na ausência de soro humano.

## 8. Perspectivas

- Realizar a transcrição *in vitro* do DNA plasmidial, a fim de obter uma curva padrão constituída por RNA sintético.
- Analisar amostras *in vivo* e *in vitro*, dos diversos estudos realizados no LATEV, em busca de confirmar a confiabilidade e aplicabilidade do fator de correlação entre cópias/mL e PFU/mL.

## 9. Referências bibliográficas

- Allison SL, Schalich J, Stiasny K, Mandl CW, e Heinz FX. Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. *J. Virol.* 2001; 75:4268–4275.
- Albuquerque BC. Febre Amarela. In: Tavares W, Marinho LAC. Rotinas de Diagnóstico e Tratamento das Doenças Infecciosas e Parasitárias. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2007. p. 403-8.
- Ashour J, Laurent-Rolle M, Shi PY, Garcia-Sastre A (2009) NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *J Virol* 83:5408–5418
- Bae HG, Nitsche A, Teichmann A, Biel SS, Niedrig M. Detection of yellow fever virus: a comparison of quantitative real-time PCR and plaque assay. *Journal of Virological Methods* 2003; 110:185–191.
- Bae, H. G. et al. Immune response during adverse events after 17D-derived yellow fever vaccination in Europe. *J. Infect. Dis.* 197, 1577–1584 (2008).
- Barrett ADT. Yellow Fever Vaccines. *Biologicals* 1997. 25: 17–25.
- Barrett AD e Monath TP. Epidemiology and ecology of yellow fever virus. *Adv Virus Res* 2003;61:291–315.
- Barrett ADT e Higgs S. Yellow Fever: A Disease that Has Yet to be Conquered. *Annu. Rev. Entomol.* 2007. 52:209–29.
- Barrett AD, Monath TP, Barban V, Niedrig M, Teuwen DE. 17D yellow fever vaccines: new insights. A report of a workshop held during the World Congress on medicine and health in the tropics, Marseille, France, Monday 12 September 2005. *Vaccine* 2007;25(April (15)):2758–65.
- Barrett ADT e Teuwen DE. Yellow fever vaccine —how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? *Current Opinion in Immunology* 2009; 21:308–313.
- Belsher, J. L. et al. Fatal multi-organ failure due to yellow fever vaccine associated viscerotropic disease. *Vaccine* 25, 8480–8485 (2007).

- Benchimol JL. História da Febre Amarela no Brasil. *Hist cienc saude-Manguinhos*. 1994;1(1):121-4.
- Bland F, McIntosh R, Bain N, Snow M. Development and validation of a range of endogenous controls to support the implementation of practical TaqMan real-time PCR-based surveillance for fish diseases within aquaculture. *J Fish Dis*. 2012; 35(6):447-54. doi: 10.1111/j.1365-2761.2012.01363.x. Epub 2012 Apr 23.
- Brasil Ministério da Saúde FUNASA. Eventos adversos sérios associados com a vacina 17D contra a febre amarela.
- Brés PLJ. A century of progress in combating yellow fever. *Bulletin of the World Health Organization* 64:775-786, 1986.
- Bronzoni RV, Madrid MC, Duarte DV, Pellegrini VO, Pacca CC, Carmo AC, Zanelli CF, Valentini SR, Santacruz-Pérez C, Barbosa JA, Lutz CS, Rahal P, Nogueira ML. The small nuclear ribonucleoprotein U1A interacts with NS5 from yellow fever virus. *Arch Virol*. 2011 Jun;156(6):931-8. Epub 2011 Feb 6.
- Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2010 Jul;23(3):550-76.
- Camacho LAB, Aguiar SG, Freire MS, Leal ML, Nascimento JP, Igushi T, et al. Reactogenicity of yellow fever vaccines in a randomised, placebo-controlled trial. *Rev Saúde Públ* 2005;39(3):413–20.
- Carter HR. 1931. *Yellow Fever: An Epidemiological and Historical Study of Its Place of Origin*. Baltimore, MD:Williams &Wilkins
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Notice to readers: fever, jaundice, and multiple organ system failure associated with 17D-derived yellow fever vaccination, 1996–2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2001;50(30):643–5.
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Reviews of Microbiology* 44:649-488, 1990.

- 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.
- Choi KH, Rossmann MG. RNA-dependent RNA polymerases from Flaviviridae. *Curr Opin Struct Biol.* 2009 Dec; 19(6):746-51. Epub 2009 Nov 14.
- Crill WD, and Roehrig JT. 2001. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J. Virol.* 75:7769–7773
- Dash PK, Boutonnier A, Prina E, Sharma S, Reiter P. Development of a SYBR green I based RT-PCR assay for yellow fever virus: application in assessment of VFA infection in *Aedes aegypti*. *Virology* 2012 Jan 22;9(1):27.
- Davidson AD. New insights into Flavivirus nonstructural protein 5. *Adv Virus Res*, 2009 74:41–101
- Domingo C, Escadafal C, Rumer L, Méndez JA, García P, Sall AA, Teichmann A, Donoso-Mantke O, Niedrig M. First international external quality assessment study on molecular and serological methods for yellow fever diagnosis. *PLoS One*. 2012;7(5):e36291. Epub 2012 May 3.
- Dulbecco R, e Vogt M. Some problems of animal virology as studied by the plaque technique. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol* 1953, 18, 273-279.
- Ellenrona K, Syed A, Johansson M (2009) Flavivirus NS5 associates with host-cell proteins zonula occludens-1 (ZO-1) and regulating synaptic membrane exocytosis-2 (RIMS2) via an internal PDZ binding mechanism. *Biol Chem* 390:319–323
- Engel AR, Vasconcelos PFC, McArthur MA, Barrett ADT. Characterization of a viscerotropic yellow fever vaccine variant from a patient in Brazil. *Vaccine* 24 (2006) 2803–2809.
- Fernandes GC, Camacho LA, Sá Carvalho M, Batista M, de Almeida SM. Neurological adverse events temporally associated to mass vaccination

against yellow fever in Juiz de Fora, Brazil, 1999-2005. *Vaccine*. 2007 Apr 20;25(16):3124-8. Epub 2007 Jan 30.

- Ferreira KV, Rocha KC, Caputto LZ, Fonseca ALA, Fonseca FLA. Histórico da febre amarela no Brasil e a importância da vacinação anti-amarela. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde* Jan./Abr. 2011; v.36, n.1, p. 40-47.
- Ferguson M, Shin J, Knezevic I, Minor P, Barrett A. WHO Working Group on technical specifications for manufacture and evaluation of yellow fever vaccines, Geneva, Switzerland, 13–14 May 2009. *Vaccine* 2010;28(December (52)):8236–45.
- Fitzner J, Coulibaly D, Kouadio DE, Yavo JC, Loukou YG, Koudou PO, et al. Safety of yellow fever vaccine during the September 2001 mass vaccination campaign in Abidjan, Ivory Coast. *Vaccine* 2004;23:156–62.
- Galler, R., Pugachev, V., Santos, L. S., Ocran, S. W. & Monath, T. P. Phenotypic and molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil. *Virology* 290, 309–319 (2001).
- Garcí'a-Montalvo BM, Medina F, del Angel RM (2004) La protein binds to NS5 and NS3 and to the 5' and 3' ends of Dengue 4 virus RNA. *Virus Res* 102:141–150
- Gardner CL, Ryman KD. Yellow fever: a reemerging threat. *Clin Lab Med*. 2010 Mar; 30(1):237-60.
- Gould EA, Solomon T. Pathogenic flaviviruses. *Lancet*. 2008 Feb 9;371(9611):500-9.
- Guerra HL, Sardinha TM, Rosa APAT, Lima e Costa MF. Efetividade da vacina anti-amarela 17D: uma avaliação epidemiológica em serviços de saúde. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*. 1997;2(2): 115-20.
- Guia de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância Epidemiológica Normas e Manuais Técnicos, 6ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; Fundação Nacional de Saúde; 2005.



- Guirakhoo, F. e cols. A single amino acid substitution in the envelope protein of chimeric yellow fever-dengue 1 vaccine virus reduces neurovirulence for suckling mice and viremia/viscerotropism for monkeys. *J. Virol.* 78, 9998–10008 (2004).
- Gurukumar KR, Priyadarshini D, Patil JA, Bhagat A, Singh A, Shah PS, Cecilia D. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Virol J.* 2009 Jan 23;6:10.
- Hahn, C. S., Dalrymple, J. M., Strauss, J. M. & Rice, C. M. Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 84, 2019–2023 (1987).
- Hayes EB: Acute viscerotropic disease following vaccination against yellow fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007, 101(10):967-971.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996 Oct;6(10):986-94.
- Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine.* 2012 Jun 19;30(29):4301-6.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: methodology. Recommended for Adoption at Step 4 of the ICH Process on 6 November 1996 by the ICH Steering Committee.
- Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol.* 1978 Sep;40(3):531-44.
- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.
- Instructions for use of products A1220, A1221, A1222 and A1223. PureYield™ Plasmid Miniprep System. Printed in USA. Revised 5/09.
- Invitrogen user manual. TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing Version O 10 April 2006; 25-0276.
- Jarrous N. and Reiner R. Human RNase P: a tRNA-processing enzyme and transcription factor. *Nucleic Acids Res.* 2007 June; 35(11): 3519–3524.

- Jentes ES, Pomeroy G, Gershman MD, Hill DR, Lemarchand J, Lewis RF, Staples JE, Tomori O, Wilder-Smith A, Monath TP. The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the Informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever. *Lancet Infect Dis* 2011; 11: 622–32.
- Kerr JA. The clinical aspects and diagnosis of yellow fever. In: Strode GK (ed) *Yellow fever*, McGraw-Hill, New York, p. 385-425, 1951.
- Khromava, A. Y. et al. Yellow fever vaccine: an updated assessment of advanced age as a risk factor for serious adverse events. *Vaccine* 23, 3256–3263 (2005).
- Lai MMC (1998) Cellular factors in the transcription and replication of viral RNA genomes: a parallel to DNA-dependent RNA transcription. *Virology* 244:1–12
- Lin RJ, Chang BL, Yu HP, Liao CL, Lin YL (2006) Blocking of interferon-induced Jak-Stat signaling by Japanese encephalitis virus NS5 through a protein tyrosine phosphatase-mediated mechanism. *J Virol* 80:5908–5918
- Lindenbach, BD e Rice CM. 2001. Flaviviridae, p. 991–1041. Em Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, e Straus SE (ed.), *Fields virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. 2007. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 1101–1152
- Mackay M, Arden E e Nitsche A Real-time PCR in Virology. *Nucleic Acids Research* 2002, vol 30 N° 6: 1292 – 1305.
- Mackenzie, J., 2005. Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic* 6, 967–977.
- Manojkumar R e Mrudula V. Applications of Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction in Clinical Virology Laboratories for the Diagnosis of Human Diseases. *Am. J. Infectious Dis.* 2006, 2 (4): 204-209.

- Mantel N, Aguirre M, Gulia S, Girerd-Chambaz Y, Colombani S, Moste C, Barban V. Standardized quantitative RT-PCR assays for quantitation of yellow fever and chimeric yellow fever-dengue vaccines. *J Virol Methods*. 2008 Jul;151(1):40-6. Epub 2008 May 22.
- Manual de vigilância epidemiológica da febre amarela – Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 1999.
- Marchevsky RS, Freire MS, Coutinho ES, Galler R. Neurovirulence of yellow fever 17DD vaccine virus to rhesus monkeys. *Virology*. 2003 Nov 10;316(1):55-63.
- Martin M, Tsai TF, Croop B, et al. Fever and multisystem organ failure associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of four cases. *The Lancet* 2001;358:98.
- Mazzon M, Jones M, Davidson A, Chain B, Jacobs M (2009) Dengue virus NS5 inhibits interferon-alpha signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation. *J Infect Dis* 200:1261–1270
- Monath TP. Yellow fever. In: Monath TP (ed) *Arboviruses: ecology and epidemiology*, Volume. V, CRC Press, Boca Raton, p.139-241, 1988.
- Monath, T. P. in *Microbe Hunters — Then and Now* (eds Oldstone, M. & Koprowski, H.) 95–111 (Medi-Ed, Bloomington, Illinois, 1996).
- Monath TP. Yellow fever: An update. *Lancet Infectious Diseases* 1:11-20, 2001.
- Monath TP, Cetron MS. Prevention of yellow fever in persons traveling to the tropics. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1369–78.
- Monath, T. P. et al. Single mutation in the flavivirus envelope protein hinge region increases neurovirulence for mice and monkeys but decreases viscerotropism for monkeys: relevance to development and safety testing of live, attenuated vaccines. *J. Virol.* 76, 1932–1943 (2002).
- Monath TP. Yellow fever vaccine. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. *Vaccines*. 4th ed. Philadelphia, WB: Saunders Company; 2004. p.1095–176.

- Monath, T. P. Yellow fever vaccine. *Expert Rev.Vaccines* 4, 553–574, 2005.
- Monath TP. Treatment of yellow fever. *Antiviral Res.* 2008 Apr; 78(1):116-24. Epub 2007 Nov 20.
- Monath TP. O desafio da Febre Amarela. In: Quadros CA. *Vacinas*. São Paulo: Roca; 2008. p. 67-76.
- Monath TP. Review of the risks and benefits of yellow fever vaccination including some new analyses. *Expert Rev Vaccines.* 2012 Apr;11(4):427-48. Review.
- Mutebi JP, Wang H, Li L, Bryant JE, Barrett ADT. Phylogenetic and evolutionary relationships among yellow fever virus isolates in Africa. *Journal of Virology* 75:6999-7008, 2001.
- Niesters HG. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods.* 2001 Dec; 25(4):419-29.
- Novais CM e Pires-Alves M. PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia Ciência e desenvolvimento*. Edição 33 julho/dezembro 2004.
- Op De Beeck A, Molenkamp R, Caron M, Ben Younes A, Bredenbeek P, Dubuisson J. Role of the transmembrane domains of prM and E proteins in the formation of yellow fever virus envelope. *J Virol.* 2003 Jan;77(2):813-20.
- Pan American Health Organization - PAHO. Casos y muertes por fiebre amarilla en región de las Américas. Pan American Health Organization, Washington, 2002.
- Pastorino B, Nougairède A, Wurtz N, Gould E, de Lamballerie X. Role of host cell factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. *Antiviral Res.* 2010 Sep;87(3):281-94. Epub 2010 May 7. Review.
- Patkar CG, Jones CT, Chang YH, Warriar R, Kuhn RJ. Functional requirements of the yellow fever virus capsid protein. *J Virol.* 2007 Jun;81(12):6471-81.

- Pinheiro FP, Moraes MAP. Febre amarela. In: Neves J. Diagnóstico e Tratamento das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1984.
- Public Health Service. Yellow fever vaccine: recommendation of the U.S. Public Health Service Advisory Committee on Immunization Practices. *Ann Intern Med* 1969;71:365–7.
- Pulendran, B. et al. Case of yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease with prolonged viremia, robust adaptive immune responses, and polymorphisms in CCR5 and RANTES genes. *J. Infect. Dis.* 198, 500–507 (2008).
- Pulendran B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. *Nat Rev Immunol.* 2009 Oct;9(10):741-7. Epub 2009 Sep 18.
- Qing M, Yang F, Zhang B, Zou G, Robida JM, Yuan Z, Tang H, Shi PY (2009) Cyclosporine inhibits flavivirus replication through blocking the interaction between host cyclophilins and viral NS5 protein. *Antimicrob Agents Chemother* 53:3226–3235
- Ribani M., Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF e Melo LFC Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova* 2004; Vol. 27, No. 5, 771-780.
- Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide Sequence of Yellow Fever Virus: Implications for Flavivirus Gene Expression and Evolution. *Science* 23 august 1985; vol. 229.
- Robertson SE, Hull BP, Tomori O, Bele O, LeDuc JW, Esteves K. Yellow Fever. A decade of reemergence. *Journal of the American Medical Association* 276:1157-1162, 1996.
- Romanos MTV. Febre Amarela e Dengue. In: Santos NOS, Romanos MTV, Wigg MD. Introdução à Virologia Humana. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p. 177-82.

- Ryman, K. D., Xie, H., Ledger, T. N., Campbell, G. A. & Barrett, A. D. Antigenic variants of yellow fever virus with an altered neurovirulence phenotype in mice. *Virology* 230, 376–380 (1997).
- Santos-Torres S, Straatmann A, Mota K, Vaconcelos PFC, Rosa APAT, Tavares-Neto J. Estado imune contra o vírus vacinal (17D) da febre amarela em duas populações do Estado da Bahia. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000;33(1):39-46.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463-7
- sanofi pasteur. Yellow fever vaccine. YF-VAX.[ Product insert]. Swiftwater, PA: sanofi pasteur; 2005. Available at [https://www.vaxserve.com/image.cfm?doc\\_id=5991&image\\_type=product\\_pdf](https://www.vaxserve.com/image.cfm?doc_id=5991&image_type=product_pdf). Accessed July 1, 2010.
- Schlesinger JJ, Brandriss MW, Putnak JR, et al. Cell surface expression of yellow fever virus non-structural glycoprotein NS1: consequences of interaction with antibody. *J Gen Virol* 1990;71:593–9.
- Schlesinger, J. J. et al. Replication of yellow fever virus in the mouse central nervous system: comparison of neuroadapted and non-neuroadapted virus and partial sequence analysis of the neuroadapted strain. *J. Gen. Virol.* 77, 1277–1285 (1996).
- Shang D, Hughes SA, Horner M, Bruce MJ, Dong Y, Carey I, Suddle AR, Agarwal K, Harrison PM, Atkins M. Development and validation of an efficient in-house real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for the quantitative detection of serum hepatitis delta virus RNA in a diverse South London population. *J Virol Methods.* 2012 Sep; 184(1-2):55-62. Epub 2012 May 18.
- Shulman LM, Hindiyeh M, Muhsen K, Cohen D, Mendelson E, Sofer D. Evaluation of Four Different Systems for Extraction of RNA from Stool Suspensions Using MS-2 Coliphage as an Exogenous Control for RT-PCR Inhibition. *PLoS One.* 2012;7(7):e39455. Epub 2012 Jul 16.

- Silva A de P e Alves MCC. Como iniciar a validação de métodos analíticos. ENQUALAB-2006 - Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia Rede Metrológica do Estado de São Paulo – REMESP 30 de maio a 01 de junho de 2006, São Paulo, Brasil.
- Sloan LM. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Verification, Validation, and Contamination Control. *Clinical Microbiology Newsletter* June 15, 2007; Vol. 29, No. 12.
- Smith HH, Theiler M. The adaptation of unmodified strains of yellow fever virus to cultivation in vitro. *J Exp Med* 1937;65(6):801–8.
- Smith CE, Gibson ME. Yellow fever in South Wales. *Med Hist* 1986; 30: 322–40.
- Staples JE, Monath TP. Yellow fever: 100 years of discovery. *JAMA* 2008;300(8):960–2.
- Staples JE, Gershman M, Fischer M; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Yellow fever vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 2010 Jul 30;59(RR-7):1-27.
- Stock NK, Boschetti N, Herzog C, Appelhans MS, Niedrig M. The phylogeny of yellow fever virus 17D vaccines. *Vaccine*. 2012 Feb 1;30(6):989-94. Epub 2011 Dec 23.
- TaqMan® Copy Number Assays Protocol. © Copyright 2010, Life Technologies Corporation. All rights reserved. Part Number 4397425 Rev. D 09/2010.
- Taylor RM. Epidemiology. In: Strode GK (ed) *Yellow fever*. McGraw-Hill, New York, p. 427-459, 1951.
- Teixeira LA. Da transmissão hídrica a culicidiana: a febre amarela na sociedade de medicina e cirurgia de São Paulo. *Rev Bras Hist*. 2001;21(41):217-42.

- Theiler M, Smith HH. The effect of prolonged cultivation in vitro upon the pathogenicity of yellow fever virus. *J Exp Med* 1937;65(6):767–86.
- Theiler M, Smith HH. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. *J Exp Med* 1937;65(6):787–800.
- Toledo GL e Ovalle II. Medidas de dispersão. In: Toledo GL e Ovalle II, editors. *Estatística Básica*. 2nd. Ed. Atlas S.A.; 1995a. P.181-226.
- Toledo GL e Ovalle II. Correlação e regressão. In: Toledo GL e Ovalle II, editors. *Estatística Básica*. 2nd. Ed. Atlas S.A.; 1995b. P.412-457.
- Tomlinson W, Hodgson RS. Centennial year of yellow fever eradication in New Orleans and the United States, 1905–2005. *La State Med Soc* 2005;157(2): 216–7.
- Trindade GF, Marchevsky RS, Filippis AM, Nogueira RM, Bonaldo MC, Acero PC, Caride E, Freire MS, Galler R. Limited replication of yellow fever 17DD and 17D-Dengue recombinant viruses in rhesus monkeys. *An Acad Bras Cienc*. 2008 Jun;80(2):311-21.
- Vainio J, Cutts F. 1998. Yellow fever. Geneva: WHO. (WHO/EPI/GEN/98.11)
- Valasek MA e Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 2005; 29: 151–159.
- Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Pinheiro FP, Dégallier N, Travassos da Rosa JFS. Febre amarela. In: Leão RNQ (ed) *Doenças Infecciosas e Parasitárias. Enfoque Amazônico*. Editora CEJUP, Belém, p. 265-284,1997.
- Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Pinheiro FP, Rodrigues SG, Travassos da Rosa ES, Cruz ACR, Travassos da Rosa JFS. *Aedes aegypti*, dengue and re-urbanization of yellow fever in Brazil and other South American Countries – Past and present situation and future perspectives. World Health Organization, *Dengue Bulletin (New Delhi)* 23:55-66, 1999.
- Vasconcelos PFC. Febre amarela. *Sociedade Brasileira de Pediatria*, Rio de Janeiro, 2000.



- Vasconcelos PFC, Luna EJ, Galler R, Silva LJ, Coimbra TL, Barros VLRS, Monath TP, Rodrigues SG, Laval C, Costa ZG, Vilela MFG., Santos CLS, Papaiordanou CMO, Alves VAF, Andrade LD, Sato HK, Rosa EST, Froguas GB, Lacava E, Almeida LMR, Cruz ACR, Rocco IM, Santos RTM, Oliva OFP, and the Brazilian Yellow Fever Vaccine Evaluation Group. Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases. *Lancet* 2001; 358: 91–97.
- Vasconcelos PFC, Costa ZG, Travassos da Rosa ES, Luna E, Rodrigues SG, Barros VLRS, Dias JP, Monteiro HAO, Oliva OFP, Vasconcelos HB, Oliveira RC, Sousa MRS, Barbosa da Silva J, Cruz ACR, Martins EC, Travassos da Rosa JFS. An epidemic of jungle Yellow fever in Brazil, 2000. Implications of climatic alterations in disease spread. *Journal of Medical Virology* 65:598-604, 2001.
- Vasconcelos PFC. Febre amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização. *Rev Bras Epidemiol.* 2002;5(3):244-58.
- Vasconcelos PFC. Yellow fever. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36(2):275-293, mar-abr, 2003.
- Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância Epidemiológica da Febre Amarela. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 1999.
- Westaway EG. Flavivirus replication strategy. *Adv Virus Res* 1987;33:45–90.
- Wang E, Weaver SC, Shope RE, Tesh RB, Watts DM, Barrett ADT. Genetic variation in yellow fever virus: duplication in the 3' noncoding region of strains from Africa. *Virology* 225:274-281, 1996.
- Werme K, Wigerius M, Johansson M (2008) Tick-borne encephalitis virus NS5 associates with membrane protein scribble and impairs interferon-stimulated JAK-STAT signalling. *Cell Microbiol* 10:696–712
- WHO (1998) WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases – Yellow fever. Geneva: WHO, Available: [http://www.who.int/csr/resources/publications/yellowfev/CSR\\_ISR\\_2000\\_1](http://www.who.int/csr/resources/publications/yellowfev/CSR_ISR_2000_1). Accessed 2012 Apr 10.

- WHO (2003) WHO-recommended standards for surveillance of selected vaccine-preventable diseases. Geneva: WHO. pp 40–44. Available: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO\\_V&B\\_03.01.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_V&B_03.01.pdf). Accessed 2012 Apr 10.
- WHO. Yellow fever reported cases. [http://apps.who.int/immunization\\_monitoring/en/globalsummary/timeseries/tsincidenceyfe.htm](http://apps.who.int/immunization_monitoring/en/globalsummary/timeseries/tsincidenceyfe.htm) (accessed Aug 11, 2010).
- Wong ML e Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005 Jul;39(1):75-85. Review.
- World Health Organization. Prevention and control of yellow fever in Africa, Geneva, 1985.
- Yocupicio-Monroy M, Padmanabhan R, Medina F, del Angel RM (2007) Mosquito La protein binds to the 3' untranslated region of the positive and negative polarity dengue virus RNAs and relocates to the cytoplasm of infected cells. *Virology* 357:29–40
- Young P. Searching for the dengue virus Achilles heel. *Microbiology australia* may 2010.
- Zlotnik PMA, Gould EA, Gao GF, Harvey PH, Holmes EC. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:548-553, 1996.

Sites consultados:

- WHO,2003 [http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO\\_V&B\\_03.01.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_V&B_03.01.pdf) (WHO – Recommended standards for surveillance of selected vaccine-preventable diseases, 2003. Geneva: WHO. pp 40–44. Acessado em 10 de outubro de 2012)
- <http://www.emedicine.com/emerg/topic645.htm>

(Shoff, W., Hinfey, P., Behrman, A. J. & Shepherd, S. Yellow fever. Emed. Journal 2, 2001. Acessado em 15 de agosto de 2012)

- Bio-manguinhos <http://www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/vacinas/febre-amarela>  
(Portal de Bio-Manguinhos. Acessado em 13 de março de 2012)
- Anvisa,2003[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/898\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/898_03re.htm)  
(ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003. Acessado em 24 de junho de 2012)
- Fiocruz. Uma breve história de Febre Amarela. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infolid=1490&sid=9&tpl=printervie>. Acesso em 25 mar. 2010.