**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**ESTUDO DOS EVENTOS VIROLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS EM
HUMANOS APÓS A IMUNIZAÇÃO COM A VACINA DA FEBRE
AMARELA YF-17DD: ANÁLISE DA CAPACIDADE DE PROTEÇÃO
CRUZADA ENVOLVENDO INFECÇÕES HETERÓLOGAS**

BEATRIZ DOS SANTOS RIBEIRO

Ribeirão Preto
2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**ESTUDO DOS EVENTOS VIROLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS EM
HUMANOS APÓS A IMUNIZAÇÃO COM A VACINA DA FEBRE
AMARELA YF-17DD: ANÁLISE DA CAPACIDADE DE PROTEÇÃO
CRUZADA ENVOLVENDO INFECÇÕES HETERÓLOGAS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientada: Beatriz dos Santos Ribeiro
Orientador: Prof. Dr. Benedito Antonio Lopes da Fonseca.

Ribeirão Preto
Julho de 2020

Ribeiro, Beatriz dos Santos.

Estudo dos eventos virológicos e imunológicos em humanos após a imunização com a vacina da febre amarela YF-17DD: Análise da capacidade de proteção cruzada envolvendo infecções heterólogas.

Ribeirão Preto, 2020.

58 p.: il.; 20 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Investigação biomédica.

Orientador: Fonseca, Benedito Antonio Lopes.

1. Febre Amarela. 2. Zika. 3. Neutralização cruzada.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Beatriz dos Santos Ribeiro

ESTUDO DOS EVENTOS VIROLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS EM
HUMANOS APÓS A IMUNIZAÇÃO COM A VACINA DA FEBRE
AMARELA YF-17DD: ANÁLISE DA CAPACIDADE DE PROTEÇÃO
CRUZADA ENVOLVENDO INFECÇÕES HETEROLOGAS.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Investigação biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Antonio Lopes da Fonseca

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Capes, Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior – Brasil”.

DEDICATÓRIA

À Deus e à minha família, sem os quais jamais conseguiria alcançar este objetivo, sempre me cobrindo de bênçãos, zelo e muito amor. Meu amor por vocês é imensurável!

AGRADECIMENTOS

Não há quem faça pesquisa sozinho, por esta razão, meus sinceros agradecimentos a todos os envolvidos direta e indiretamente para que este objetivo fosse concluído:

Primeiramente à Deus que nunca faltou em minha vida, sempre guiando meus pensamentos e protegendo-me de tudo que estivesse fora de Seus planos para mim;

Aos meus pais Paulo e Tiana, irmãos Paulo e Giovana e sobrinha Heloísa que sempre me apoiaram e forneceram-me a base para que este objetivo pudesse ser concluído. Além de todo amor e carinho que recebo deles, de perto ou com toda a distância durante este período que me permite dizer: eu tenho a melhor família do mundo! Eu amo vocês!!;

Ao meu noivo Hugo que esteve comigo em todas as etapas deste estudo, enxugando minhas lágrimas e dando-me forças para seguir e a toda sua família Cláudia, Marcelo, Natália, Lorena, Renata, Raiane, Goreti, Lando, Rogéria, Roberta, Adriano, Luciana, Felipe, tia Estela, Tio Edson, todos os primos e a todos não citados, mas incluídos que estiveram comigo nos momentos em que não pude estar perto da minha. Vocês foram fundamentais, muito obrigada!!

À Luna, minha cadela de estimação, que me acompanhou em cada viagem e me deu muito amor e força nos momentos em que eram somente eu e ela. Pacotinho de amor que me rendeu muitas risadas e aconchego;

À família Santos representada pela Jane, Creuza, Mariana, Rafael, Otávio, Gustavo e Livia que me fizeram uma visita em Ribeirão Preto, matando minha saudade por vocês e proporcionando muitas risadas. Amo vocês!!

Às amigas de Rondonópolis Ana Lúcia e Fabiulla que tiraram um tempo de suas férias para fazer-me uma visita e à Polianna, Haíssa e Thais que não conseguiram fazer a visita, mas não furavam nenhum encontro das BBSAs em Rondonópolis para matarmos a saudade e colocarmos em dias nossas conversas;

À minha orientadora de iniciação científica, Dr. Claudinéia de Araújo, que surgiu como um anjo na minha vida acadêmica e proporcionou-me uma riqueza de conhecimentos que carregarei por toda vida, além de ser minha ponte ao mestrado. Eu a admiro pela pessoa guerreira e especial que és, muito obrigada por tudo!!

Ao meu orientador do mestrado Dr. Benedito que abriu as portas do seu laboratório para o meu trabalho, sendo uma pessoa com uma bagagem excepcional e que me permitiu alcançar mais este objetivo, muito obrigada!!

À Taline que me ajudou de diversas maneiras a iniciar este trabalho e que dividiu comigo muitas experiências maravilhosas que carregarei por toda vida e aos amigos de Ribeirão Preto Flávia, Wendell, Ana Luisa, Fábio, Luiza, Daniel, Márcio, Vitor, Marcus, Mayara, Jonathan, Fran, Thales, Mirela e Daniele que dividiram comigo muitas risadas, sorvetes, pizzas e churrascos. Obrigado por terem participado da minha vida de uma forma tão boa. Vocês são especiais para mim!!

A todo o Centro de Pesquisa em Virologia: Adriana, Danillo, Michelli, Leonardo, Dr. Eurico, Dona Leira, Maria Lúcia, Soraya e todos não mencionados, mas também inclusos que fizeram parte desta história, muito obrigada!!

À enfermagem e funcionários da UETDI-HC de Ribeirão Preto que auxiliaram meu trabalho e também fizeram isso acontecer;

Á todos os voluntários envolvidos que cederam um tempo durante os 6 meses de coleta para colaborar com a evolução da pesquisa no Brasil, muito obrigada!!

Ao Émerson da Secretaria da pós-graduação da Clínica Médica que sempre esteve a disposição para sanar minhas dúvidas e me auxiliar no que fosse preciso, muito obrigada!!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo ao meu trabalho e a pesquisa no Brasil;

Pela USP por me receber durante esses anos e a todos ligados a ela que de alguma maneira auxiliaram-me e deram-me todo o suporte necessário;

E por último e não menos importante, à Ribeirão Preto, esta cidade maravilhosa que tive a honra de residir durante 4 anos, local onde fui muito feliz apesar da distância da minha família.

MUITO OBRIGADA!!!!!!

EPÍGRAFE

“Consagre ao Senhor tudo o que faz e os seus planos serão bem-sucedidos. ”

Provérbios 16:3

RESUMO

RIBEIRO, B.S. Estudo dos eventos virológicos e imunológicos em humanos após a imunização com a vacina da febre amarela YF-17DD: análise da capacidade de proteção cruzada envolvendo infecções heterólogas. 2020. 101f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A infecção pelo vírus zika (ZIKV) e suas enfermidades relacionadas tomou proporções devastadoras, principalmente devido a sua capacidade de causar anormalidades fetais, como a microcefalia e complicações neurológicas como a Síndrome de Guillian-Barré. A única forma de prevenção é o controle do vetor, uma vez que ainda não existe uma vacina aprovada. Uma outra arbovirose que permanece sendo um sério problema em áreas endêmicas da África tropical e subtropical e também na América do Sul, incluindo o Brasil, é a febre amarela. O último surto da doença no Brasil iniciou-se no ano de 2017 na região sudeste e, apesar da diminuição, ainda há relatos de casos, inclusive no ano de 2020. No entanto, uma vacina segura e efetiva, contra o vírus da febre amarela (YFV), desenvolvida por Max Theiler e colaboradores encontra-se disponível há mais de 65 anos e vem garantindo uma proteção acima de 98% a seus receptores. A vacinação com a cepa YF-17DD leva à produção de anticorpos neutralizantes que conferem alta proteção contra infecções pelo YFV. Por serem geneticamente mais próximos, os flavivírus podem conferir proteção imunológica cruzada para outros membros virais da família Flaviviridae após infecções heterólogas. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de neutralização cruzada do ZIKV, em indivíduos imunizados com a vacina da febre amarela 17DD. Coletas do sangue de 12 indivíduos foram realizadas nos pontos 30, 60, 90 e 180 dias após a imunização com a vacina e a presença de anticorpos neutralizantes contra YFV e a neutralização cruzada do ZIKV foram avaliadas por meio do teste de neutralização por redução de placa (PRNT). Todos os indivíduos apresentaram anticorpos neutralizantes para o YFV, confirmando a soro-conversão após a imunização com a vacina e 58,5% dos indivíduos apresentaram neutralização cruzada contra o ZIKV, confirmando o potencial de reação cruzada entre esses vírus, que por pertencerem à mesma família compartilham estruturas semelhantes que permitem este fenômeno. Visto que a infecção causada pelo vírus zika continua sendo uma preocupação para a Saúde Pública, principalmente para o grupo de gestantes, além de não possuir uma vacina como forma de prevenção, em contrapartida a febre amarela possui uma vacina altamente eficaz, o fato de existir uma neutralização cruzada, principalmente nos primeiros 3 meses após a imunização pode funcionar como ferramenta de prevenção para mulheres que pretendem engravidar, sendo este o período crítico de infecção com o ZIKV na gestação. Esses resultados indicam um potencial uso da vacina para a febre amarela como ferramenta de vigilância para as gestantes, sendo o principal grupo de risco na infecção pelo ZIKV.

Palavras-chave: Febre amarela, ZIKV, neutralização cruzada.

ABSTRACT

RIBEIRO, B.S. Study of virological and immunological events in humans following immunization with YF-17DD yellow fever vaccine: analysis of cross-protection using heterologous infections. 2020. 101f. Dissertation (Master degree). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Zika virus (ZIKV) infection and its related diseases has taken devastating proportions, mainly due to its ability to cause fetal abnormalities such as microcephaly and neurological complications such as Guillian-Barré Syndrome. The only way to prevent it is the vector control, once there is no approved vaccine yet. Another arbovirus that remains a serious problem in endemic areas of tropical and subtropical Africa and also in South America, including Brazil, is the yellow fever virus (YFV). The last outbreak of the disease in Brazil began in 2017 in the southeastern region and, despite the decrease, there are reported cases, even at the year of 2020. However, a safe and effective vaccine for YFV, developed by Max Theiler and collaborators, is available for over 65 years and has been providing over 98% protection to its receivers. Vaccination with the YF-17DD strain leads to the production of neutralizing antibodies that confer high protection against YFV infections. For being genetically close, the flaviviruses can provide immunological cross-protection to other viral members of Flaviviridae family after heterologous infections. Therefore, the aim of this study was to evaluate the potential for cross-neutralization of ZIKV in individuals immunized with the 17DD vaccine. Blood collections of 12 individuals were taken at the points 30, 60, 90 and 180 days after immunization with the vaccine and the presence of YFV neutralizing antibodies and cross-neutralization against ZIKV was assessed by the plaque reduction neutralization test (PRNT). All subjects had neutralizing antibodies to YFV, confirming serum conversion after immunization with the vaccine, and 58.5% of subjects had cross-neutralization against ZIKV, confirming the potential for cross-reaction between these viruses because they belong to the same family they share similar structures that allow this phenomenon. Since the infection caused by the ZIKV remains a concern for Public Health, especially for the group of pregnant women, in addition to not using a vaccine as a means of prevention, in contrast to yellow fever caused by a highly effective infection or the fact that cross-neutralization occurs, especially in the first 3 months after immunization, can work as a prevention tool for women who intend to record, this being the critical period of infection with ZIKV during pregnancy. These results indicate a potential use of the yellow fever vaccine as a surveillance tool for pregnant women, being the main risk group for ZIKV infection.

Key words: Yellow fever, ZIKV, cross-neutralization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ficha para coleta de dados epidemiológicos dos indivíduos envolvidos na pesquisa, contendo informações pessoais (nome, idade, raça, endereço, registro no HC, gênero, profissão e telefone) e clínicas (primo-vacinado ou revacinado com data, contato prévio com os vírus dengue e zika, residência em área endêmica da febre amarela, diagnóstico para HIV e outras vacinas recentes).

Figura 2. A. Ilustração do teste imunocromatográfico mostrando a banda controle, bandas testes e o local a ser depositado primeiro a amostra e por último, o buffer.

B. Ilustração do teste imunocromatográfico: **1-** Demonstrando a marcação da banda no caso de resultado negativo; **2-** Demonstrando a marcação da banda no caso de positividade apenas para IgM; **3-** Demonstrando a marcação da banda no caso de positividade apenas para IgG; **4-** Demonstrando a marcação da banda no caso de positividade para ambos os anticorpos; **5-** Indicando a marcação da banda no caso de invalidez do teste.

Figura 3. Imagem do teste de PRNT realizado mostrando positividade para febre amarela. A região em roxo representa o tapete celular não destruído e os pontos brancos representam a placa viral (Uma unidade viral que destruiu uma célula e devido a viscosidade do CMC, atingiu apenas células vizinhas, formando o ponto branco). O teste foi realizado em duplicata, onde o poço superior à esquerda representa o controle negativo e a partir dele, as diluições de 1:20 a 1:20.480. Nota-se um aumento na quantidade de placas em cada poço, caso este aumento seja numericamente significativo com relação ao controle, o teste conclui-se positivo.

Figura 4. Scatter plot contendo cada valor e a média de idade dos grupos, de acordo com o gênero.

Figura 5. Teste sorológico do tipo imunocromatográfico para o ZIKV. Apenas a banda de controle foi marcada, demonstrando os resultados negativos para os anticorpos IgM e IgG.

Figura 6. Teste sorológico do tipo imunocromatográfico para o DENV. Apenas a banda controle foi marcada, demonstrando os resultados negativos para os anticorpos do tipo IgM e IgG.

Figura 7. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 1 (P1), para o YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE (sobreposição dos dois anteriores).

Figura 8. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 2 (P2), para o YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE (sobreposição dos dois anteriores).

Figura 9. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 3 (P3), para o YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE (sobreposição dos dois anteriores).

Figura 10. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 4 (P4), para o YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE (sobreposição dos dois anteriores).

Figura 11. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 5 (P5), para o YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE (sobreposição dos dois anteriores).

Figura 12. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 6 (P6), para o YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE (sobreposição dos dois anteriores).

Figura 13. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 7 (P7), para o YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE (sobreposição dos dois anteriores).

Figura 14. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 8 (P8), para o YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE (sobreposição dos dois anteriores).

Figura 15. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 9 (P9), para o YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE (sobreposição dos dois anteriores).

Figura 16. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 10 (P10), para o YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE (sobreposição dos dois anteriores).

Figura 17. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 11 (P11), para o YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE (sobreposição dos dois anteriores).

Figura 18. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 12 (P12), para o YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE (sobreposição dos dois anteriores).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados dos testes PRNT e Imunofluorescência indireta. Para o PRNT, o valor representado consiste no título de PRNT₅₀ de cada indivíduo para o YFV e o ZIKV, em cada período de coleta das amostras (30, 60, 90 e 180 dias). Para a IFI, os parâmetros utilizados foram a positividade e intensidade dos testes.

LISTA DE ABREVIACÕES

ZIKV – Vírus zika;

RNA – Ácido ribonucleico;

PCR – Reação em cadeia da polimerase;

RT – Transcrição reversa;

YFV – Vírus febre amarela

PRNT – Teste de neutralização por redução de placa;

CRIE – Centro de referências para imunobiológicos especiais;

HC – Hospital das clínicas;

FMRP – Faculdade de medicina de Ribeirão Preto;

USP – Universidade de São Paulo;

CONEP – Comissão nacional de ética em pesquisa;

UETDI – Unidade especial de tratamento de doenças infecciosas;

PFU – Teste de unidade formadora de placa;

CMC – Carboximetilcelulose;

IFI – Teste de imunofluorescência indireta;

OMS – Organização mundial de saúde;

CVE – Centro de vigilância epidemiológica.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. A infecção pelo ZIKV	18
1.2. A infecção pelo YFV	19
1.3. Proteção imunológica cruzada	21
2. JUSTIFICATIVA.....	24
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. Geral	26
3.2. Específicos	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. Indivíduos e amostras clínicas	28
4.2. Teste sorológico do tipo imunocromatográfico	29
4.3. Cepas e titulação do ZIKV e YFV	30
4.4. Imunofluorescência indireta (IFI)	31
4.5. Teste de Neutralização por Redução de Placa (PRNT).....	31
5. RESULTADOS.....	35
5.1. Dados epidemiológicos dos participantes.....	35
5.2. Teste sorológico do tipo imunocromatográfico	35
5.3. Imunofluorescência indireta (IFI)	36
5.4. Teste de Neutralização por Redução de Placa (PRNT).....	42
6. DISCUSSÃO.....	45
7. CONCLUSÃO	49
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	51
9. REFERÊNCIAS	53
ANEXOS	57

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A família *Flaviviridae* é composta por aproximadamente 73 vírus, sendo que cerca de 40 causam doenças em humanos (MONATH; BURKE, 2001). Dentre essas doenças, as infecções causadas pelo vírus da febre amarela (YFV) e pelo vírus zika (ZIKV), ambos pertencentes ao gênero *Flavivirus*, são uma das que assumem maior importância no nosso país (FIGUEIREDO; FONSECA, 2005).

1.1. A infecção pelo ZIKV

A infecção causada pelo vírus Zika (ZIKV) é uma arbovirose que vem preocupando a saúde pública nos últimos anos. Segundo o Ministério da Saúde, até dezembro de 2016 foram registrados 211.770 casos da infecção por este vírus no Brasil e embora o grande surto tenha passado, de dezembro de 2019 a maio de 2020, foram reportados 3.509 casos novos (MS, 2017; MS, 2020).

O ZIKV pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, assim como o vírus da Dengue (DENV), YFV bem como o vírus da Encefalite Japonesa (JEV) e o vírus West Nile (WNV). Seu genoma é composto por um RNA de fita simples de polaridade positiva codificando uma única poliproteína que é processada por proteases virais e hospedeiras em três proteínas estruturais (C, prM / M, E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) que estão envolvidas na replicação do vírus e em sua patogenicidade (CONDE *et.al.*, 2017).

A transmissão do ZIKV ocorre através da picada de um mosquito infectado pelo vírus. Acredita-se que o mosquito *Aedes aegypti* seja o principal vetor do ZIKV nos ambientes urbanos, de acordo com estudos de transmissão realizados em laboratório (WEGER-LUCARELLI *et.al.*, 2016). No entanto, outros trabalhos demonstraram que algumas espécies do gênero *Culex* (HART *et.al.*, 2017) e do gênero *Aedes* (PLOURDE; BLOCH, 2016) também são transmissores competentes do ZIKV.

Os sintomas clínicos da infecção pelo ZIKV são inespecíficos e podem ser diagnosticados como outras doenças infecciosas, especialmente aquelas decorrentes de arbovírus como dengue e chikungunya (MUSSO, 2016). A infecção geralmente é assintomática, ou pode apresentar sintomas brandos como febre baixa, artralgia, mialgia, dor de cabeça, exantema, conjuntivite (CAMPOS *et.al.*, 2015), e raramente dor abdominal, diarreia e fotofobia.

O grande problema são suas implicações. O ZIKV destingue-se de outros flavivírus por sua capacidade de causar infecção transplacentária, anormalidades fetais e transmissão vetorial independente através de fluidos corporais em seres humanos (TRIPATHI *et. al.*, 2017). Além disso, a infecção pelo ZIKV apresenta forte relação com o desenvolvimento da Síndrome de Guillian-Barré (SMITH; MACKENZIE, 2016), uma grave doença autoimune, geralmente pós-infecciosa, que se manifesta como paralisia progressiva durante 1-3 semanas, com uma taxa de mortalidade de 5% e até 20% dos pacientes, que podem ficar com sequelas incapacitantes (YUKI; HARTUNG, 2012). O diagnóstico da infecção pelo vírus zika é realizado por meio de testes sorológicos e moleculares que se baseia na reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do genoma viral (DUARTE *et. al.*, 2017).

O ZIKV foi introduzido no Brasil possivelmente em 2014 e disseminou-se primeiramente na região Nordeste do país (FANTINATO *et. al.*, 2016). Em março de 2015, o Ministério da Saúde começou a investigar a origem do surto e se os sintomas relatados se caracterizavam como dengue, rubéola ou febre de Chikungunya, mas resultados preliminares excluíram infecções por esses patógenos (HEUKELBACH *et. al.*, 2016). Após a confirmação do surto ser causado pelo ZIKV, uma relação entre a infecção intrauterina e a microcefalia precoce em neonatos foi inicialmente proposta, baseada na observação de médicos do Nordeste do Brasil, que detectaram um súbito aumento na incidência de nascimentos de crianças microcefálicas, após a identificação da entrada do vírus no Brasil (NUNES *et. al.*, 2016).

Atualmente existem iniciativas para o controle do vetor da doença na tentativa de prevenção não apenas da infecção pelo ZIKV, mas de outros arbovirus como DENV, Chikungunya (CHIKV) e YFV que permanecem sendo patógenos de grande importância na saúde pública.

1.2. A infecção pelo YFV

Uma outra arbovirose que permanece sendo um sério problema em áreas endêmicas da África tropical e subtropical e também na América do Sul, incluindo o Brasil, é a febre amarela.

O YFV é o protótipo da família Flaviviridae e tem sido usado como modelo para elucidar a organização genômica dos flavivírus bem como a sua replicação (BURKE; MONATH, 2001). O YFV é mantido em dois ciclos básicos: um ciclo urbano e um ciclo silvestre que diferem entre si quanto à natureza de seus transmissores nos continentes Africano e Americano (VASCONCELOS, 2003).

Esse vírus é disseminado no meio urbano através da picada de fêmeas infectadas do mosquito *Aedes aegypti*, em ambos continentes. Nesse ciclo, ocorre uma transmissão basicamente entre homem-mosquito, ou seja, o homem infectado através da picada do mosquito *Aedes aegypti* torna-se uma fonte de disseminação do vírus durante a fase virêmica da doença. Além disso, geralmente, o próprio homem é o responsável pela introdução do vírus no ambiente urbano ao penetrar em nichos silvestres (VASCONCELOS, 2003).

Na febre amarela silvestre, a transmissão do vírus ao homem ocorre a partir de um primata não-humano infectado, o qual é picado por mosquitos do gênero *Haemagogus* e *Sabethes* nas Américas e do gênero *Aedes* na África (VASCONCELOS, 2003).

As manifestações clínicas da doença podem ser divididas em: leve, moderada, grave e maligna. Segundo Vasconcelos, aproximadamente 90% dos casos de febre amarela que desenvolvem algum quadro clínico se enquadram na forma leve. Esses indivíduos apresentam um quadro típico de febre moderada, acompanhada por dores de cabeça e indisposição passageira (BENENSON, 1983). Indivíduos acometidos pelas formas graves apresentam um início abrupto de febre elevada acompanhada de fortes dores de cabeça, icterícia, hematêmese ou oligúria, além de se notar com maior frequência a ocorrência de bradicardia concomitantemente a febre alta, evento denominado sinal de Faget (FIGUEIREDO; FONSECA, 2005). Em aproximadamente 20% dos casos a doença evolui de uma forma mais grave com febre, vômitos, dores epigástricas, icterícia, falência renal e hemorragia (MONATH; BURKE, 2001).

O vírus da febre amarela é prevalente na África e nas Américas, porém é nativo da África, onde causa epidemias desde o século XVII, sendo responsável por mais de 90% dos casos de febre amarela notificados anualmente à OMS (GUBLER, 2002).

No Brasil, a febre amarela foi identificada pela primeira vez, no estado de Pernambuco, em 1685, e se consolidou como uma importante endemia até o início do século passado. Nas últimas décadas, a febre amarela no Brasil foi observada como uma doença enzoótica em uma área cobrindo os estados do Acre, Amazonas, Roraima, Amapá, Pará, Maranhão, Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e do Distrito Federal. No ano de 1998, houve uma expansão dessa área para o sul e leste do país notificando-se ocorrências de surtos em Minas Gerais, uma epizootia no Rio Grande do Sul, em 2000 e 2001 em outros estados brasileiros e mais recentemente, em 2016 e 2017 nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (CVE, 2002).

Considerando-se a cobertura vacinal, a maior imunidade devido à vacinação anti-amarílica concentra-se na área endêmica, com 95% da população vacinada, contudo esse dado não se estende a uma grande parte da população presente em uma área denominada indene, correspondente à costa brasileira, onde a cobertura vacinal é praticamente nula (VASCONCELOS, 2003). Por essa razão, somada a ampla distribuição do mosquito *Aedes*, um novo surto de febre amarela atingiu o Brasil. De acordo com o Ministério da Saúde, 792 casos foram confirmados, com 274 casos de óbitos confirmados no período de dezembro de 2016 a maio de 2017, sendo a região Sudeste mais afetada (MS, 2017). O vírus continua circulando no país ainda em 2020, porém com maior número de casos na região Sul, onde dos 761 casos notificados, 311 são do estado de São Paulo, sem nenhuma confirmação e 228 são da região Sul, com 13 dos 14 casos confirmados no Brasil (MS, 2020).

Uma vacina segura e efetiva desenvolvida por Max Theiler e colaboradores encontra-se disponível há mais de 65 anos e vem garantindo uma proteção acima de 98% a seus receptores por pelo menos 10 anos (THEILER, 1937; REINHARDT, 1998; QUEREC, 2006).

Essa vacina, conhecida como YF-17DD, foi atenuada a partir de uma cepa selvagem denominada Asibi isolada em Ghana no ano de 1927. Max Theiler e colaboradores, induziram a atenuação dessa cepa através de múltiplas passagens do vírus, realizadas inicialmente em macacos, posteriormente em camundongos e, finalmente, em tecidos de ovos embrionados (QUEREC, 2006). Uma das principais características do vírus atenuado obtido por esse processo é a elevada estabilidade genética, com apenas 48 alterações nucleotídicas em todo seu genoma, que garantiram um baixo viscerotropismo e neurotropismo mantendo as características estruturais idênticas as do vírus selvagem (LEFREUVE, 2006).

1.3. Proteção imunológica cruzada

Outro aspecto relacionado aos flavivírus em geral, é a capacidade dos mesmos em conferir proteção imunológica cruzada após infecções heterólogas, ou seja, após infecção com dois ou mais vírus, ambos pertencentes à mesma família.

A reação cruzada entre as principais arboviroses como dengue, febre amarela e zika atrapalham o diagnóstico da mesma, sendo necessário uma confirmação com outro teste mais específico. Este evento ocorre devido a interação de anticorpos subneutralizantes que são capazes de reconhecer outros vírus genética e estruturalmente semelhantes. Contudo, esta interação é fraca, diferente do que ocorre na neutralização cruzada cuja interação ocorre com

anticorpos do tipo neutralizantes, altamente específicos e que desaparece em poucos meses (PAVANI, 2019).

Historicamente, foi descrito que durante uma grande epidemia de febre amarela no século 19 ocorrida na África, trabalhadores vindos da Índia e soldados britânicos que prestaram serviços nesse mesmo país foram menos suscetíveis à infecção. A hipótese levantada é que esse fenômeno tenha ocorrido provavelmente porque esses indivíduos teriam sido expostos anteriormente a outros flavivirus como o DENV, WNV ou JEV circulantes naquela região (ASHCROFT, 1979).

Em estudos recentes utilizando-se um modelo de infecção em hamster (TESH, 2001; XIAO, 2001), pesquisadores avaliaram a hipótese da proteção à infecção pelo YFV após imunização prévia com flavivirus heterólogos. Observou-se que hamsters previamente infectados com o vírus da encefalite de St Louis (SLEV), JEV, WNV ou DENV-1, ao serem desafiados posteriormente com uma cepa virulenta do YFV, mostraram-se assintomáticos quando comparados com os animais *naive* infectados unicamente com a cepa do YFV (XIAO, 2003).

A proteção cruzada também foi avaliada em um trabalho de imunização de hamsters com a cepa vacinal do JEV, cepa selvagem do SLEV e cepa vacinal YF-17DD do YFV, que foram posteriormente desafiados com o WNV. Observou-se que houve uma diminuição da gravidade da infecção causada pelo último vírus no que se refere ao desenvolvimento de uma encefalite fatal (TESH, 2002).

Dessa maneira, trabalhos sobre a investigação dos aspectos da proteção cruzada entre ZIKV e YFV, desenvolvida após a vacinação com a cepa YF-17DD, se tornam pertinentes na medida em que se deseja conhecer a segurança e eficácia desse tipo de vacina em diferentes grupos tais como, imunocomprometidos ou até mesmo em indivíduos suscetíveis a outros arbovírus.

A proposta geral deste projeto é investigar se a imunização com a vacina YF-17DD contra o YFV auxilia no desenvolvimento de alguma proteção contra a infecção pelo ZIKV, pelo menos nos primeiros meses que se seguem à vacinação.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

As enfermidades e complicações relacionadas a infecção pelo ZIKV são de extrema importância para a Saúde Pública, que ainda carece de uma vacina como forma de prevenção. Em contrapartida, a YF-17DD contra a febre amarela possui uma alta eficácia. Sabendo-se que infecções prévias a certos vírus heterólogos parecem modular a gravidade da infecção pelo YFV, a investigação de uma possível neutralização cruzada da vacina YF-17DD na infecção pelo ZIKV é de grande relevância, principalmente em gestantes que poderiam obter essa proteção no primeiro trimestre de gestação, sendo o período mais crítico da infecção pelo ZIKV neste grupo.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a possível proteção cruzada entre os anticorpos dos vírus da febre amarela e zika.

3.2. Específicos

- Confirmar a ausência de anticorpos anti-zika e anti-dengue usando teste sorológico do tipo imunocromatográfico;
- Detectar, através do Teste de Neutralização por Redução de Placa (PRNT), anticorpos neutralizantes para os vírus febre amarela e zika, de indivíduos imunizados com a vacina YF-17DD;
- Avaliar por imunofluorescência a presença de anticorpos anti-YFV para o vírus da febre amarela e a reação cruzada para ZIKV em indivíduos imunizados com a vacina YF-17DD.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Laboratório de Virologia Molecular do Centro de Pesquisa em Virologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), da Universidade de São Paulo (USP).

4.1. Indivíduos e amostras clínicas

Foram incluídos neste estudo indivíduos vacinados no CRIE (Centro de Referência para Imunobiológicos Especiais) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP-USP). Os indivíduos vacinados foram imediatamente contatados e, mediante a sua autorização, acompanhados para as respectivas coletas. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) com o número 97416718.8.0000.5440, e todos os indivíduos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Além disso, um questionário para coleta de dados contendo informações pessoais e clínicas foi preenchido por cada participante da pesquisa, como mostra a figura 1.

Nome:		Registro:	
Idade:		Gênero:	
Raça:		Profissão:	
Endereço:		Telefone:	
Data da 1ª vacinação:			
Data da vacinação atual:			
Doenças prévias:	Dengue: SIM () DATA: NÃO ()		
	Zika: SIM () DATA: NÃO ()		
Residência em área endêmica	Sim () NÃO () Período:		
Status HIV:	Positivo () Negativo ()		
Outras vacinas recentes:			

Figura 1. Ficha para coleta de dados epidemiológicos dos indivíduos envolvidos na pesquisa, contendo informações pessoais (nome, idade, raça, endereço, registro no HC, gênero, profissão e telefone) e clínicas (primo-vacinado ou revacinado com data, contato prévio com os vírus dengue e zika, residência em área endêmica da febre amarela, diagnóstico para HIV e outras vacinas recentes).

Amostras de sangue dos participantes foram coletadas na Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas (UETDI) do HC-FMRP-USP. Cerca de 5ml de sangue venoso periférico foram coletados, utilizando-se tubo à vácuo com gel separador nos períodos

de 30, 60, 90 e 180 dias após a imunização com a vacina da febre amarela YF-17DD. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas, o soro aliquoteado e armazenado à -20°C até o momento de uso.

4.2. Teste sorológico do tipo imunocromatográfico

Para detecção de anticorpos do tipo IgM e IgG para os vírus dengue e zika foi realizado o teste sorológico do tipo imunocromatográfico, conhecido como “teste rápido”. Foi utilizado o soro dos participantes coletado com 180 dias, garantindo a detecção da possível infecção com estes vírus por todo o período de coleta. Este teste é sensibilizado com o vírus de interesse e quando em contato com a amostra, caso haja a presença de anticorpo contra determinado vírus, o teste é marcado na região de interesse. A banda controle é marcada, garantindo a qualidade do teste. A detecção de anticorpos anti-ZIKV foi realizada por meio do teste da empresa Lumiquick diagnostics-17021569, e o a detecção de anticorpos anti-DENV foi realizada com o teste da empresa Wama diagnóstica-17LO13. Ambos os testes garantem alta sensibilidade quanto ao seu resultado.

Para tanto, 20µl de soro foram aplicados no dispositivo de teste, em seguida, 3 gotas de buffer proveniente de cada kit na região indicada, como mostra a figura 2 A. Após 15 minutos é feita a leitura do resultado, como mostra a figura 2 B.

Figura 2 A. Ilustração do teste imunocromatográfico mostrando a banda controle, bandas testes e o local a ser depositado primeiro a amostra e por último, o buffer.

Figura 2 B. Ilustração do teste imunocromatográfico: **1-** Demonstrando a marcação da banda no caso de resultado negativo; **2-** Demonstrando a marcação da banda no caso de positividade apenas para IgM; **3-** Demonstrando a marcação da banda no caso de positividade apenas para IgG; **4-** Demonstrando a marcação da banda no caso de positividade para ambos os anticorpos; **5-** Indicando a marcação da banda no caso de invalidade do teste.

4.3. Cepas e titulação do ZIKV e YFV

As cepas utilizadas para a realização dos experimentos no presente estudo foram ZikaBr (ZIKV) e YF-17DD (YFV vacinal), ambas já existentes no Laboratório de Virologia Molecular. O estoque viral foi preparado em células Vero (célula de *rim de macaco verde africano*) e armazenado à -80°C até o momento do uso.

Para quantificar os estoques produzidos, a titulação viral foi realizada utilizando-se o ensaio de Unidade Formadora de Placa (PFU). O estoque foi serialmente diluído 10 vezes em DMEM 1X a 0% (contendo 0% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico) e 200µl de cada diluição foram inoculados em monocamada de células Vero confluentes, semeadas em placa de 24 poços no dia anterior. O ensaio foi realizado em duplicata e a placa foi mantida a temperatura ambiente, em plataforma móvel por 1 hora para a adsorção viral. Em seguida, o inóculo foi retirado e 500µl de meio semi-sólido de carboximetilcelulose (CMC) a 1,5% (contendo meio DMEM 2X, 2% de soro bovino fetal e 1% de antibiótico) foi adicionado para permitir que a partícula viral infecte apenas as células vizinhas, formando assim a placa viral. Posteriormente, a placa foi incubada à 37°C/5%CO₂ durante 4 à 5 dias para o ZIKV e 5 à 6 dias para o YFV vacinal. As placas foram fixadas com formol 1% e coradas com cristal violeta 1% para determinar a quantidade de placas virais formadas (PFU) por mililitro de meio (ml).

4.4. Imunofluorescência indireta (IFI)

O teste de imunofluorescência foi utilizado para detecção de anticorpos totais e avaliação da reação cruzada entre ZIKV e YFV. O teste foi padronizado no laboratório do presente estudo. O experimento foi realizado para ambos os vírus e como controle negativo, utilizou-se um soro sabidamente negativo para ambas as infecções virais. Para tanto, uma lamínula circular foi colocada em cada poço de uma placa de 24 poços, para que 6×10^4 células Vero fossem semeadas. A placa foi incubada por um dia em estufa $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$. No dia seguinte, as células foram infectadas pelos vírus zika e febre amarela, separadamente, com MOI de 1, por uma hora e 30 minutos em temperatura ambiente e a placa foi mantida sob agitação constante em plataforma móvel. Após esta etapa, o inóculo foi retirado e $500\mu\text{l}$ de meio DMEM 1X a 0% foi adicionado em cada poço. A placa foi mantida por dois dias em estufa $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$. Após esse período, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS 1X e fixadas com formol 10% por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, lavadas novamente por 3 vezes com PBS 1X e incubadas em solução de bloqueio (PBS 1X com 1% de BSA e 0,1% de saponina) por 30 minutos em câmara úmida a 37°C . As mesmas foram incubadas posteriormente com $20\mu\text{l}$ do anticorpo primário (Ponto de coleta 30 dias com diluição 1:20 diluída em solução de bloqueio) por 1 hora em câmara úmida a 37°C . Em seguida, foram lavadas 5 vezes com PBS 1X e incubadas com $20\mu\text{l}$ do anticorpo secundário marcado com fluoróforo – FITC (marcador da partícula viral) e DAPI (marcador do núcleo celular) por 30 minutos em câmara úmida a 37°C . Por fim, foram lavadas por 5 vezes com PBS 1X (última lavagem com água milique) e depositadas sobre uma lâmina com $5\mu\text{l}$ de solução de montagem (Fluoromount), com a monocamada de células voltada para baixo. As lamínulas analisadas em microscópio de fluorescência.

4.5. Teste de Neutralização por Redução de Placa (PRNT)

Para avaliar a presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV (neutralização específica) e de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV (neutralização cruzada) induzidos pela vacinação, o protocolo de Russell et al. (1967) foi utilizado, com adaptações.

Dessa forma, cada amostra de sangue coletado dos participantes da pesquisa foi submetida ao ensaio de PRNT para ambos os vírus, no mesmo dia, garantindo as mesmas condições e evitando variações entre os experimentos. Uma alíquota com $25\mu\text{l}$ de soro foi

inativada em banho maria, à 56°C por 1 hora, para garantir a desnaturação das proteínas do complemento e haja apenas a ação dos anticorpos neutralizantes contra o vírus. Em seguida, o mesmo foi diluído por 11 vezes, de forma seriada em DMEM 1X a 0% (iniciando a diluição em 20 vezes), e 100µl de cada diluição foi incubada com 100µl de uma quantidade fixa de partículas infecciosas do YFV e do ZIKV (60 PFU), separadamente, por 1 hora em estufa à 37°C/5%CO₂. Esse passo é importante para que o anticorpo neutralizante possa se ligar ao vírus. Como controle negativo da reação o soro foi substituído por DMEM 1X a 0%. A mistura do complexo anticorpo-vírus foi inoculada em monocamadas de células Vero confluentes, semeadas em placas de 24 poços no dia anterior, e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação constante. Em seguida, o inóculo foi removido, 500µl do meio semi-sólido de CMC 1,5% foram adicionados, e a placa foi incubada a 37°C/5%CO₂, por 4 a 5 dias para o ZIKV, e 5 a 6 dias para o YFV. Após este período de incubação, as monocamadas de células foram fixadas com 1ml de formol 10% por 30 minutos em agitação média, coradas com 200µl de cristal violeta 1% por 15 minutos em agitação média, e o número de placas foi contado manualmente através do transiluminador de cor branca. Aqueles soros que apresentaram uma redução de 50% no número de placas, em comparação ao controle negativo, foram considerados positivos para a presença de anticorpos neutralizantes para o YFV e para o ZIKV, respectivamente, como mostra a figura 3.

Os dados foram processados e analisados através do software GraphPad Prisma 6, utilizando a ferramenta de regressão linear.

Figura 3. Imagem do teste de PRNT realizado mostrando positividade para febre amarela. A região em roxo representa o tapete celular não destruído e os pontos brancos representam a placa viral (Uma unidade viral que destruiu uma célula e devido a viscosidade do CMC, atingiu apenas células vizinhas, formando o ponto branco). O teste foi realizado em duplicata, onde o poço superior à esquerda representa o controle negativo e a partir dele, as diluições de 1:20 a 1:20.480. Nota-se um aumento na quantidade de placas em cada poço, caso este aumento seja numericamente significativo com relação ao controle, o teste conclui-se positivo.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Dados epidemiológicos dos participantes

Um total de 12 indivíduos obtiveram 4 coletas completas nos 4 períodos propostos neste estudo (30, 60, 90 e 180 dias), totalizando 48 amostras de sangue. Houve grande dificuldade para recrutar mais indivíduos com todas as coletas concluídas, uma vez que os intervalos entre cada coleta foram grandes e com isso, muitos participantes não mantiveram mais contato, realizaram mudança inesperada para outras regiões, não atualizaram números telefônicos, e também desistiram de participar da pesquisa. Dessa forma, foram recrutados 3 homens com idade média de 42 anos e 9 mulheres com idade média de 34 anos (Figura 4). Dos 12 indivíduos, 3 eram primo-vacinados (receberam a vacina da febre amarela pela primeira vez) e 9 revacinados (receberam a vacina pela segunda vez).

Figura 4. Scatter plot contendo cada valor e a média de idade dos grupos, de acordo com o gênero.

5.2. Teste sorológico do tipo imunocromatográfico

O teste rápido realizado para a investigação de anticorpos anti-ZIKV apresentou resultado negativo em 100% das amostras coletadas, tanto para o anticorpo do tipo IgM quanto para o anticorpo do tipo IgG, como mostra na figura 5. O mesmo aconteceu com o teste rápido realizado para a investigação de anticorpos anti-DENV (Figura 6).

Figura 5. Teste sorológico do tipo imunocromatográfico para o ZIKV. Apenas a banda de controle foi marcada, demonstrando os resultados negativos para os anticorpos IgM e IgG.

Figura 6. Teste sorológico do tipo imunocromatográfico para o DENV. Apenas a banda controle foi marcada, demonstrando os resultados negativos para os anticorpos do tipo IgM e IgG.

5.3. Imunofluorescência indireta (IFI)

O teste de imunofluorescência foi realizado para ambos os vírus a fim de observar a soro-conversão dos indivíduos após a imunização com a vacina YF-17DD e a presença da reação cruzada para o ZIKV. Para tanto, os soros dos indivíduos coletados após 30 dias da vacinação foram utilizados nesse teste, para garantir a produção de anticorpos em todos os participantes: os primo-vacinados e os revacinados. A detecção de anticorpos neutralizantes anti-YFV foi observada em todos os indivíduos, como mostram as figuras 7 a 18. A presença desses anticorpos foi observada em maior intensidade em células que foram infectadas pelo YFV, confirmando a eficácia da vacina que é

específica para esse vírus. Em relação ao ZIKV, observou-se nesse ensaio a presença de fluorescência de menor intensidade nas células que foram infectadas pelo ZIKV, demonstrando que os anticorpos anti-YFV reconheceram, em menor proporção, antígenos do ZIKV. Portanto, o ensaio de imunofluorescência indica a presença de reação cruzada para o ZIKV.

Figura 7. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do controle negativo e do indivíduo 1 (P1), para o YFV e ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE.

Figura 8. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 2 (P2), para o YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE.

Figura 9. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 3 (P3), para o YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE.

Figura 10. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 4 (P4), para YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE.

Figura 11. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 5 (P5), para o YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE.

Figura 12. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 6 (P6), para o YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE.

Figura 13. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 7 (P7), para o YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE.

Figura 14. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 8 (P8), para o YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE.

Figura 15. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 9 (P9), para o YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE.

Figura 16. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 10 (P10), para o YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE.

Figura 17. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 11 (P11), para o YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE.

Figura 18. Teste de imunofluorescência indireta das amostras de soro do indivíduo 12 (P12), para o YFV e o ZIKV. Na primeira coluna encontra-se a fluorescência com DAPI, a segunda coluna com FITC e a terceira o MERGE.

5.4. Teste de Neutralização por Redução de Placa (PRNT)

O teste PRNT é considerado padrão ouro para detectar e quantificar anticorpos neutralizantes do tipo IgM e IgG. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), um título de anticorpo igual ou superior a 1/10 é considerado protetor para flavivírus.

Todas as amostras coletadas de todos os participantes foram submetidas ao teste de PRNT tanto para o YFV quanto para o ZIKV, separadamente. Após a conclusão de cada teste, o número de placas de cada poço foi contado, feito a taxa de neutralização referente ao controle negativo, este valor plotado no software Prisma com programa de regressão linear e dado o valor de PRNT₅₀ segundo as recomendações da OMS.

Todas as amostras apresentaram a presença de anticorpos neutralizantes para amarelo YFV, com títulos de PRNT₅₀ variando de 1/12 a 1/270. Em relação ao ZIKV, 58,5% (7/12) dos indivíduos apresentaram neutralização cruzada com valor de PRNT₅₀ inferior ao observado para o YFV, com variação dos títulos de 1/18 a 1/31, visto que consiste numa neutralização cruzada (subneutralização), logo, não específica para o ZIKV. Dos 7 indivíduos que apresentaram neutralização cruzada, 3 apresentaram detecção desses anticorpos até 90 dias após a vacinação, 3 até 60 dias após a vacinação e 1 com 30 dias após a vacinação. Nenhuma das amostras apresentaram neutralização cruzada após 180 dias da vacinação. Os valores de PRNT₅₀ para ambos os vírus e a positividade/intensidade do teste de IFI estão ilustrados na tabela 1.

Tabela 1. Resultados dos testes PRNT e Imunofluorescência indireta. Para o PRNT, o valor representado consiste no título de PRNT₅₀ de cada indivíduo para o YFV e o ZIKV, em cada período de coleta das amostras (30, 60, 90 e 180 dias). Para a IFI, os parâmetros utilizados foram a positividade e intensidade dos testes.

	PRNT ₅₀									
	30 DIAS		60 DIAS		90 DIAS		180 DIAS			
INDIVÍDUO	YFV	ZIKV	YFV	ZIKV	YFV	ZIKV	YFV	ZIKV	IFI-YFV	IFI-ZIKV
1	106	26	154	18	270	25	38	0	+ forte	+ fraco
2	255	0	146	0	128	0	82	0	+ forte	+ fraco
3	91	20	90	0	184	0	165	0	+ forte	+ fraco
4	134	0	76	0	78	0	33	0	+ forte	+ fraco
5	82	26	67	20	76	0	156	0	+ forte	+ fraco
6	216	20	108	20	80	0	47	0	+ forte	+ forte
7	28	20	34	20	77	20	68	0	+	+ fraco
8	68	31	65	28	45	0	20	0	+ forte	+ fraco
9	49	0	30	0	187	0	86	0	+ forte	+ fraco
10	161	29	179	0	158	20	148	0	+ forte	+ fraco
11	34	0	39	0	52	0	12	0	+ forte	+ forte
12	146	0	126	0	43	0	40	0	+ forte	+ forte

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Apesar da grande epidemia da doença causada pelo vírus zika ter ocorrido em 2016, com 211.770 números de casos confirmados, 11.052 casos de gestantes infectadas e o número de bebês com microcefalia ter aumentado consideravelmente, em 2019 e 2020 essa arbovirose continua sendo uma grande preocupação para a saúde pública (MS,2017; MS,2020). Ainda hoje, não existe uma vacina aprovada que proteja contra o ZIKV, sendo assim, apenas o controle do vetor é utilizado como forma de prevenção à infecção. Por outro lado, a vacina contra a febre amarela YF-17DD, desenvolvida por Max Theiler e colaboradores, confere aos imunizados cerca de 98% de proteção, sendo considerada uma vacina altamente eficaz (THEILER, 1937; REINHARDT, 1998; QUEREC, 2006). Além disso, essa vacina está disponível em 19 estados com recomendação no Brasil, garantindo assim uma alta cobertura de proteção (MS, 2019). A existência de uma proteção cruzada entre os vírus que pertencem à mesma família, como é o caso do YFV e ZIKV, pode ser uma estratégia de prevenção para as doenças que não possuem ainda uma vacina como forma de prevenção.

Apesar do presente estudo avaliar a neutralização cruzada entre YFV e ZIKV, o DENV também é um membro pertencente da família Flaviviridae, e a cidade de Ribeirão Preto encontra-se em uma área endêmica deste vírus. Portanto, a investigação da presença de anticorpos anti-DENV se fez necessária. De acordo com informações obtidas dos participantes, nenhum deles relatou apresentar sintomas semelhantes a infecção pelo DENV e pelo ZIKV. Contudo, devido à alta taxa de infecção assintomática para essas arboviroses (CAMPOS, 2015), fez-se necessário a confirmação sorológica e os resultados dos testes imunocromatográficos confirmaram a ausência de contato prévio com ambos os vírus. Apesar deste teste possuir uma alta sensibilidade, o evento de reação cruzada pode ocorrer para os vírus pertencentes a uma mesma família, podendo gerar um resultado falso-positivo. Contudo, neste caso, geralmente a banda possui um tom mais claro, e para melhor esclarecimento é importante realizar o teste rápido para o outro vírus suspeito, que no caso de positividade apresentará a banda forte confirmatória. Optamos por utilizar as amostras coletadas após 180 dias da vacinação, para garantir que os participantes não tiveram contato com o DENV ou o ZIKV em todo o período do estudo.

Para realizar a detecção e quantificação dos anticorpos neutralizantes anti-YFV, e avaliar se esses anticorpos poderiam reconhecer de alguma forma antígenos do ZIKV, o ensaio de PRNT foi realizado, pois é considerado o teste padrão-ouro para o diagnóstico e diferenciação entre os flavivírus, segundo a OMS. Apesar de ser padrão ouro, o PRNT não é utilizado para diagnóstico

de rotina devido sua alta demanda de tempo e dinheiro. Existem diferentes tipos de leitura para o PRNT, variando de acordo com a finalidade do teste, como por exemplo a leitura de PRNT₉₀ que detecta uma neutralização de 90% do anticorpo em relação ao vírus, sendo uma neutralização altamente específica (MAEDA, 2013). Para este estudo foi utilizada a leitura de PRNT₅₀ que detecta anticorpos capazes de neutralizar 50% do vírus. Trata-se de uma leitura de especificidade média visto que o objetivo do estudo foi identificar a existência de neutralização cruzada entre os anticorpos anti-YFV e o ZIKV. Para YFV, foram detectados anticorpos neutralizantes para todos os indivíduos, tanto vacinados quanto revacinados, mostrando a soro-conversão após a imunização com a vacina. Os títulos de PRNT₅₀ para este vírus variou entre 1/12 a 1/270, na qual o valor mínimo encontrado foi de um indivíduo revacinado, na coleta 60 dias e o valor máximo, encontrado de um indivíduo também revacinado, na coleta 90 dias. Como descrito nos resultados, a variação que se observou nos títulos anticorpos neutralizantes anti-YFV dos participantes, demonstra a variação das respostas imunológicas entre os indivíduos. Contudo, apesar dessa variação, de acordo com a OMS os títulos de anticorpos neutralizantes iguais ou maiores que 1/10 são considerados protetores para os flavivírus, portanto todos os indivíduos vacinados desenvolveram anticorpos neutralizantes anti-YFV.

Em relação ao ZIKV, o resultado obtido de que 58,5% (7/12) dos indivíduos apresentaram neutralização cruzada foi bastante interessante, demonstrando que, de alguma forma a vacina YF-17DD foi capaz de conferir certa proteção contra o ZIKV, e apenas 1 dose da vacina já foi suficiente para observar esse efeito em alguns indivíduos, como já foi reportado em outros trabalhos (NORONHA, 2017; OMS, 2013). O fato de os títulos de anticorpos apresentarem-se em níveis mais baixos do que os observados para o YFV era esperado, visto que se trata de uma neutralização não específica, por isso títulos mais baixos, no entanto, protetores. Dos 7 indivíduos que apresentaram neutralização cruzada, 3 foram protegidos contra o ZIKV até 90 dias após a imunização, 3 foram protegidos até 60 dias e 1 até 30 dias após a imunização com a vacina. Além disso, 2/3 dos indivíduos primo-vacinados apresentaram neutralização cruzada.

A neutralização cruzada entre os anticorpos anti-YFV e o ZIKV é descrita na literatura em modelo animal utilizando camundongos, que foram vacinados com a 17DD, e posteriormente desafiados com o ZIKV. Os resultados demonstraram que a vacina conferiu proteção e auxiliou na modulação da doença nesses animais (VICENTE, 2019). Este fenômeno também foi encontrado em trabalhos anteriores com outros flavivírus, como o estudo realizado por Tesh e colaboradores, que avaliou a imunização de hamsters com a cepa vacinal do JEV, com a cepa selvagem do SLEV e cepa vacinal do YFV, que foram desafiados posteriormente com o WNV. Os resultados obtidos

demonstraram uma diminuição da gravidade da infecção pelo WNV, observando-se a ausência do desenvolvimento de encefalite fatal.

O fenômeno da neutralização cruzada pode explicar a ausência de casos clínicos ou a baixa taxa de infecção por vírus como o West Nile que circulam no Brasil, onde seus vetores possuem uma condição favorável para reprodução (CASTRO-JORGE; SICONELLI, 2019). Uma vez que a infecção pelo ZIKV seja altamente perigosa para gestantes para o desenvolvimento fetal, principalmente no primeiro trimestre de gestação, a existência da neutralização cruzada pode atuar como uma alternativa preventiva a infecção por esse vírus.

Apesar da detecção de anticorpos neutralizantes anti-YFV com efeito neutralizante nas partículas infectantes de ZIKV em 7 dos 12 indivíduos no presente estudo, foi possível observar um efeito de reação cruzada em todas as amostras analisadas no teste de imunofluorescência, demonstrando a íntima relação de moléculas estruturais conservadas entre esses dois vírus pertencentes a família Flaviviridae, o que explica esse evento de reconhecimento cruzado, e que pode ocorrer em testes diagnósticos de rotina (XAVIER, 2017). O efeito de reação cruzada observado na técnica de imunofluorescência é classicamente observado em outros trabalhos, e demonstra que a presença de anticorpos subneutralizantes são os responsáveis por esse fenômeno, pois reconhecem o antígeno com baixa especificidade, se ligam, mas não apresentam capacidade de neutralização.

Os achados deste trabalho complementam o entendimento da neutralização cruzada envolvendo infecções heterólogas, trazendo uma realidade em amostras humanas. Esta informação pode ser utilizada como ferramenta de vigilância na forma de prevenção paliativa a infecção pelo ZIKV, principalmente para o grupo de risco, na ausência de uma vacina efetiva. A base desse estudo pode se estender para a prevenção de outras arboviroses causadas por flavivírus de relevância para a saúde pública.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Este estudo conclui que além da reação cruzada entre os flavivírus ser alta, a neutralização cruzada em infecções heterólogas está presente e apresenta-se efetiva, pois os anticorpos neutralizantes produzidos pela vacina YF-17DD protegem contra o ZIKV de forma significativa nos primeiros meses após a imunização. Os dados gerados abrem a possibilidade de uma nova ferramenta de prevenção, principalmente às gestantes no primeiro trimestre de gestação, período crítico para o feto caso haja uma infecção com o ZIKV.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A sugestão deixada para trabalhos futuros é a avaliação da neutralização cruzada para outros flavivírus de importância na Saúde Pública e a possível relação deste evento com o aparecimento e intensidade de outras arboviroses causadas por flavivírus no Brasil.

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

ASHCROFT, M.T. Historical evidence of resistance to yellow fever acquired by residence in India. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg, v.73(2), p.247-248, 1979.

BENENSON, A. S. Controle das doenças transmissíveis no homem. Washington: Organização Pan-Americana da Saúde, 13 ed. 1983. Publicação Científica; 442

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre do chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. 2017, v. 48, nº 3.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes Aegypti* (dengue, chikungunya e zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 21, 2020. 2020, v. 51.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Emergência epidemiológica de febre amarela no Brasil, no período de dezembro de 2016 a julho de 2017. 2017, v. 48, nº 28.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da febre amarela no monitoramento 2019/2020. 2020, v. 51, nº 20.

BRASIL. Ministério da Saúde. Orientações quanto à vacinação contra a febre amarela. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/o-ministro/920-saude-de-a-a-z/febre-amarela/10771-vacinacao-febre-amarela>. Acesso em: dez. 2019.

BURKE, D.S.; MONATH, T.P. Flaviviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, v.1, cap.33, p. 1096 – 1097.

CAMPOS, G.S.; BANDEIRA, A.C.; SARDI, S.I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. Emerging Infectious Diseases. Vol. 21, No. 10, Outubro 2015.

Castro-Jorge, L.A.; Siconelli, M.J.L.; Ribeiro, B.S.; Moraes, F.M.; Moraes, J.B.; Agostinho, M.R.; Klein, T.M.; Floriano, V.G.; Fonseca, B.A.L. West Nile virus infections are here! Are we prepared to face another flavivirus epidemic? Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine. Vol.:52:e20190089: 2019. Doi: 10.1590/0037-8682-0089-2018

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – CVE. Febre Amarela: Informe técnico 2002. São Paulo: Imprensa Oficial, 2002.

CONDE, J.N.; SILVA, E.M.; BARBOSA, A.S. AND MOHANA-BORGES, R. (2017) The Complement System in Flavivirus Infections. Front. Microbiol. 8:213. doi: 10.3389/fmicb.2017.00213.

DUARTE, G.; MORON, A. F.; TIMERMAN, A.; FERNANDES, C.E.; NETO, C. M.; FILHO, G.L.A.; JUNIOR, H.W.; SANTO, H.F.B.E.; STEIBEL, J.A.P.; FILHO, J.B.; ANDRADE, J.B.B.; BURLÁ, M.; SÁ, M.F. S.; BUSO, N.E.; GIRALDO, P.C.; SÁ, R.A.M.; JUNIOR, R.P.; MATTAR, R.; FRANCISCO, R.P.V. Zika Virus Infection in Pregnant Women and Microcephaly. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2017;39:235–248. [https://doi.org/ 10.1055/s-0037-1603450](https://doi.org/10.1055/s-0037-1603450).

FANTINATO, F.F.S.T.; ARAÚJO, E.L.L.A.; RIBEIRO, I.G.; ANDRADE, M.R.; DANTAS, A.L.M.; RIOS, J.M.T.; SILVA, O.M.V.; SILVA, M.S.; NÓBREGA, R.V.; BATISTA, D.A.; LEITE, P.L.; SAAD, E.; PERCIO, J.; RESENDE, E.A.; SOUZA, P.B.; WADA, M.Y. Descrição dos primeiros casos de febre pelo vírus Zika investigados em municípios da região Nordeste do Brasil, 2015. *Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília*, 25(4):683-690, out-dez 2016. Doi: 10.5123/S1679-49742016000400002.

FIGUEIREDO, L.T.M. & FONSECA, B.A.L. Dengue. In: VERONESI, R.; FOCCACIA, R. "Tratado de Infectologia". São Paulo: Atheneu., 2005. p. 201.

GUBLER, D.J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Archives of Medical Research*, v.33, p.330-342, 2002.

HART, C.E.; ROUNDY, C.M.; AZAR, S.R.; HUANG J.H.; YUN, R.; REYNOLDS, E.; LEAL, G.; NAVA, M.R.; VELA, J.; SARTK, P.M.; DEBBOUN, M.; ROSSI, S.; VASILAKIS, N.; THANGAMI, S.; WEAVER, S.C. Zika Virus Vector Competency of Mosquitoes, Gulf Coast, United States. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 23, No. 3, Março 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2303.161636>.

HEUKELBACH, J.; ALENCAR, C.H.; KELVIN, A.A.; OLIVEIRA, W.K.; Cavalcanti, L. P. G. Zika virus outbreak in Brazil. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2016; 10(2):116-120.

LEFREUVE, A. Host-cell interaction of attenuated and wild-type strains of yellow fever virus can be differentiated at early stages of hepatocyte infection. *Microbes and Infection*. V. 8, p.1530-1538, 2006.

MAEDA, A.; MAEDA, J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *The veterinary Journal, Japão*, 195(2013) 33-40, 2012. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.08.019>

MONATH, T.P.; BURKE, D.S. Flaviviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, v.1, cap.33, p. 1095 – 1096.

MUSSO, D.; GUBLER, D.J. 2016. Zika virus. *Clin Microbiol Rev* 29:487–524. doi:10.1128/CMR.00072-15.

NORONHA, T.G.; CAMACHO, L.A.B. Controvérsias sobre a ampliação das áreas com vacinação de rotina contra a febre amarela no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v.33, n.10, p.1-13, 2017

NUNES, M.L.; CARLINI, C.R.; MARINOWIC, D.; NETO, F.K.; FIORI, H.H.; SCOTTA, M.C.; et al. Microcephaly and Zika virus: a clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil. *J Pediatr (Rio J)*. 2016;92:230-40.

Pavani, D. F. P. Imunidade cruzada entre os principais arbovírus de importância em Saúde Pública no Brasil. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização-Vigilância Laboratorial em Saúde Pública) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, CEFOR/SUS-SP, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2019.

PLOURDE, A.R.; BLOCH, E.M. A Literature Review of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 22, No. 7, Julho 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2207.151990>.

QUEREC, T. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *Journal Experimental Medicine*, v.203, p. 412-424, 2006.

REINHARDT, B. Development of viremia and humoral and cellular parameters of immune activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: a model of human flavivirus infection. *Journal of Medical Virology*, v.56, p. 159-167, 1998.

RUSSELL, P.K.; NISALAK, N.; SUKHAVACHANA, P.; VIVONA, S. A Plaque Reduction Test for Dengue Virus Neutralizing Antibodies. *Journal of Immunology*, v. 99, p.285-290, 1967.

SMITH, D.W.; MACKENZIE, J. Zika virus and Guillain-Barré syndrome: another viral cause to add to the list. *The Lancet*. Vol. 387, P. 1531, Fevereiro 2016. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00564-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00564-X).

TESH, R.B. Experimental yellow fever virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). 1. Virologic, biochemical and immunologic studies. *J. Infect. Dis*, v. 183, p.1431-1436, 2001.

TESH, R.B. Immunization with heterologous flaviviruses protective against fatal West Nile encephalitis. *Emerging Infectious Diseases*, v.8, p.245-251, 2002.

THEILER, M. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. *J. Exp. Med.*, v. 65. 787-800, 1937.

TRIPATHI, S.; BALASUBRAMANIAM, V.R.M.T.; BROWN, J.A.; MENA, I.; GRANT, A.; BARDINA, S.V.; et al. (2017) A Novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. *PLoS Pathog* 13(3): e1006258. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006258>.

VASCONCELOS, P.F.C. Yellow Fever. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.36, p. 275-293, 2003.

Vicente, A.C.; Guedes-da-Silva, F.H.; Dumard, C.H.; Ferreira, V.N.S.; Costa, I.P.S.; Machado, R.A.; Barros-Aragão, F.G.Q.; Neris, R.L.S.; Dos-Santos, J.S.; Assunção-Miranda, I.; Figueiredo, C.P.; Dias, A.A.; Gomes, A.M.O.; Guedes, H.L.M.; Oliveira, A.C.; Silva, J.L. Yellow Fever Vaccine Protects Resistant and Susceptible Mice Against Zika Virus Infection. *BioRxiv*, 2019. **Doi:** <https://doi.org/10.1101/587444>

WEGER-LUCARELLI, J.; RUCKERT C; CHOTIWAN, N.; NGUYEN, C.; GARCIA LUNA, S.M.; FAUVER, J.R., et al. (2016) Vector Competence of American Mosquitoes for Three Strains of Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis* 10(10): e0005101.doi:10.1371/journal.pntd.0005101.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Recommendations to Assure the Quality, Safety and Efficacy of Live Attenuated Yellow Fever Vaccines. Report. Geneva, 2010. (WHO technical report series).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. Immunization, Vaccines and Biologicals. Geneva, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Vaccines and vaccination against yellow fever. WHO position paper – June 2013. *Wkly Epidemiol Rec* 2013; 88:269-84.

Xavier, E. M. Avaliação de uma nova abordagem diagnóstica baseada em um nanocompósito para a Leishmaniose visceral. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2014.

XIAO, S. West Nile infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*): a model for West Nile encephalitis. *Emerg. Infect. Dis.*, v.7, p. 714-721, 2001.

XIAO, S. Alteration of clinical outcome and histopathology of yellow fever virus infection in a hamster model by previous infection with heterologous flaviviruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.68, p. 695-703, 2003.

YUKI, N.; HARTUNG, H.P. Guillain–Barré Syndrome. *The New England Journal of Medicine*. Junho 2012, at NEJM.org. Doi: 10.1056/NEJMr1114525.

ANEXOS

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE
FONE: 3602-1000/FAX (016) 3633-1144

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o senhor (a) a participar do nosso estudo intitulado:

**ESTUDO DOS EVENTOS VIROLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS EM HUMANOS APÓS A IMUNIZAÇÃO COM A VACINA DA FEBRE
AMARELA YF-17DD: ANÁLISE DA CAPACIDADE DE INFECÇÃO CRUZADA ENVOLVENDO INFECÇÕES HETERÓLOGAS**

Pesquisadores responsáveis: Benedito Antônio Lopes da Fonseca

Beatriz dos Santos Ribeiro

Telefones para contato: 0xx16 3602-3251 (Laboratório de Virologia Molecular)

ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DA PESQUISA

A doença causada pelo vírus zika é de grande importância para a saúde pública, levando em consideração o número de pessoas infectadas e as complicações causadas por essa doença. Os vírus da febre amarela e zika pertencem ao mesmo grupo e, por esse motivo, compartilham algumas semelhanças em seu material genético que podem interferir numa proteção cruzada (proteção adquirida após a infecção por um determinado vírus proteger também contra outro vírus) por um determinado tempo. A vacina da febre amarela YF-17DD está presente no calendário de vacinação do Brasil e consegue abranger parte da população. Caso haja a possível proteção cruzada, as pessoas vacinadas estariam protegidas também ao vírus zika, por um determinado tempo. Por essa razão, investigaremos neste projeto se a vacina da febre amarela desempenha, ao menos por um período de tempo, uma proteção cruzada contra o vírus zika. Para isso, serão necessárias 4 (quatro) coletas de sangue nos pontos: 30, 60, 90 e 180 dias após a vacinação, para posterior análise do material.

Caso o senhor (a) concorde em participar desta pesquisa, precisamos de seu consentimento para que utilizemos suas amostras de sangue. É importante ressaltar que há um risco associado à coleta de sangue. Ressaltamos também que seu nome será mantido em sigilo absoluto não sendo divulgado em nenhum momento desta pesquisa (a menos que os dados sejam extraviados e com isso ocorra uma eventual exposição dos resultados da pesquisa e perda do anonimato). Esta pesquisa atenderá plenamente à Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, bem como suas complementares. Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto por um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionarem pesquisas em seres humanos que estão sendo feitas na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar da mesma. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto está localizado no Subsolo do Hospital e funciona das 8:00 às 17:00 horas. O telefone de contato é o (16) 3602-2228.

Gostaríamos de esclarecer que a sua participação no estudo é voluntária.

Eu _____ portador do RG: _____ E CPF: _____, tendo sido devidamente esclarecido(a) sobre todas as condições que constam do documento "ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DA PESQUISA", de que trata o Projeto de Pesquisa intitulado "ESTUDO DOS EVENTOS VIROLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS EM HUMANOS APÓS A IMUNIZAÇÃO COM A VACINA DA FEBRE AMARELA YF-17DD: ANÁLISE DA CAPACIDADE DE INFECÇÃO CRUZADA ENVOLVENDO INFECÇÕES HETERÓLOGAS", especialmente no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

1. A garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa.
2. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à minha privacidade.
3. O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar dele participando.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Nome do paciente: _____ Assinatura _____ Data: _____

Nome do pesquisador: _____ Assinatura _____ Data: _____