



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS

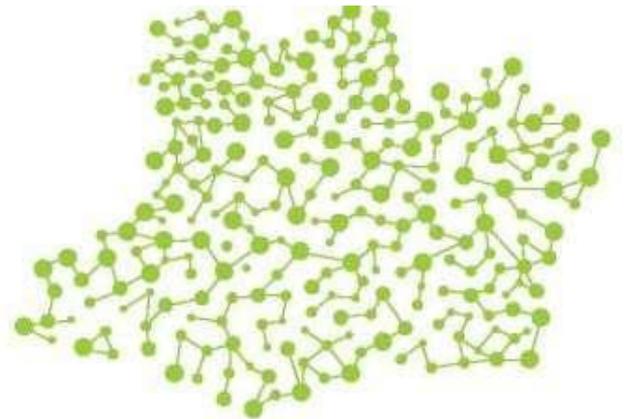


**NÍVEIS DE ANTICORPOS ANTIAMARÍLICOS E DESFECHO DA GESTAÇÃO EM
GESTANTES QUE APRESENTARAM INFECÇÃO POR ZIKA. ESTUDO DE
COORTE EM MANAUS, BRASIL**

ISA CRISTINA RIBEIRO PIAULINO

MANAUS

2022



ISA CRISTINA RIBEIRO PIAULINO

**NÍVEIS DE ANTICORPOS ANTIAMARÍLICOS E DESFECHO DA GESTAÇÃO EM
GESTANTES QUE APRESENTARAM INFECÇÃO POR ZIKA. ESTUDO DE
COORTE EM MANAUS, BRASIL**

Projeto de dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, como requisito para obtenção grau de Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas.

Orientador (a): Prof^a Dra Flor Ernestina Martinez Espinosa

Co-orientador (a): Dra. Márcia da Costa Castilho

MANAUS

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

http://repositorioinstitucional.uea.edu.br:8080/ficha/ficha_catalografica.php

FOLHA DE JULGAMENTO**NÍVEIS DE ANTICORPOS ANTIAMARÍLICOS E DESFECHO DA GESTAÇÃO EM GESTANTES QUE APRESENTARAM INFECÇÃO POR ZIKA. ESTUDO DE COORTE EM MANAUS, BRASIL****ISA CRISTINA RIBEIRO PIAULINO**

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.

Banca Julgadora:

Presidente

Membro

Membro

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me amparar nos momentos mais desafiadores, pois sem ele, nada disso seria possível.

Aos meus pais Isabel Cristina Ribeiro da Silva Piauilino e Eisenhower da Silva Piauilino, por todo o apoio, carinho e incentivo. Agradeço a minha mãe por sempre mostrar que embora seja difícil o caminho, ainda sim é possível. Ao meu pai pelas palavras encorajadoras e de apoio total.

A minha irmã Ítala Cristina Ribeiro Piauilino por sempre estar comigo e mostrar veracidade e empenho no que faz, incentivando-me a buscar sempre mais.

Aos meus irmãos Tawan Ribeiro Piauilino e Eisenraver da Silva Piauilino Júnior que embora sejam mais novos, são visionários e surpreendem com sua dedicação e determinação.

Aos meus tios Maria da Guia Resende da Silva e Getúlio Clementino Ribeiro Sobrinho por me acolherem e não medirem esforços em ajudar em tudo que foi preciso.

A minha orientadora Dra. Flor Ernestina Martinez Espinosa, que foi de fundamental importância para o meu desenvolvimento no meio da pesquisa científica.

A minha co-orientadora Dra. Márcia da Costa Castilho, que sempre busca me auxiliar da melhor forma possível, a fim de obter um bom desempenho no desenvolvimento e execução do projeto. Contribuindo assim, para a minha evolução.

Ao Maurício Teixeira Lima, um excelente “pós-doc”, que foi de fundamental importância para a padronização da técnica de neutralização por redução de placa (PRNT), no qual deu-me embasamento e oportunidade de obter um amplo conhecimento na parte de cultura de células na área laboratorial.

Ao Sérgio Damasceno, farmacêutico bioquímico que está sempre disposto a ajudar e auxiliar no andamento do projeto.

Ao Raillon Keven dos Santos Souza, aluno de iniciação científica e parceiro de laboratório na jornada de aprendizado de cultivo celular e padronização da técnica de PRNT.

A Maianne Yasmin Oliveira Dias, uma biomédica parceira que se apresenta, sempre em prontidão para auxiliar-me no que for preciso na área profissional.

A Yanka Karolinn Batista Rodrigues, uma bióloga parceira que está sempre à disposição para ajudar no que for preciso.

Ao Ayrton Sena Gouveia, por ajudar-me nas análises estatísticas.

Agradeço a Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado e a Gerência Virologia da FMT-HVD, pela oportunidade de trabalho em equipe e por obter uma das melhores experiências na área científica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente cooperaram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso”. John Ruskin

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Projeto intitulado Zika vírus na Amazônia Ocidental Brasileira: Gerando evidências para o manejo e controle de um novo problema de saúde pública, Subprojeto: Níveis de anticorpos antiamarílicos em pacientes com infecção aguda pelo vírus da Zika, em nome do Pesquisador Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda. Convênio 01.16.0057.00, FINEP 0251/16.

Projeto intitulado Infecção por vírus Zika em gestantes com doença exantemática aguda e sua relação com o crescimento e desenvolvimento neuropsicomotor das crianças expostas em Manaus, Amazonas. The Ministry of Health of Brazil (PPSUS; and DECIT-TED 51/2019); and Leônidas and Maria Deane Institute (ILMD/ Fiocruz Amazônia) in partnership with the Nacional Council for Scientific and Technological Development (CNPq) [grand number 400911/2018-3n]. “The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Características epidemiológicas, clínicas, nutrológicas, virológicas, histopatológicas e imunológicas da infecção por vírus Zika em gestantes com doença exantemática aguda e sua relação com a microcefalia ou eventuais desfechos adversos em Manaus, Amazonas.

DECIT/MS/ CNPq

o Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde (DECIT-MS).

RESUMO

A febre do Zika é uma doença febril infecciosa com sintomatologia similar à causada por outros arbovírus, mas pode ocasionar alterações congênicas ao ser transmitida pela mãe infectada ao feto. Na epidemia do Zika Vírus em 2016, os estudos sugeriam uma diferença na distribuição regional da Síndrome Congênita, levantando a hipótese que em áreas de transmissão de Febre Amarela onde a cobertura vacinal é elevada, como na região Amazônica, poderia ter uma proteção cruzada. Com o objetivo de descrever a relação entre anticorpos antiamarílicos e o desfecho da gestação, um estudo foi desenvolvido em gestantes com doença exantemática que apresentaram infecção aguda pelo vírus Zika confirmada por RT-PCR. Os anticorpos antiamarílicos foram aferidos por PRNT e foram considerados como desfechos graves da gestação quando houve perda fetal, natimortalidade ou microcefalia no recém-nascido; desfecho moderado, quando houve parto prematuro, baixo peso ao nascer e/ou atraso no crescimento intrauterino e sem desfecho indesejado, quando nenhum destes eventos foi identificado. Foram incluídas 56 gestantes sendo que nove delas (16,1%) tiveram um desfecho grave, 20 (35,7%) moderado e 27 (48,2%) não tiveram evidência de desfecho adverso ao parto. O desfecho grave foi mais frequente entre as gestantes que apresentaram a infecção no primeiro trimestre da gestação. Foram evidenciados anticorpos neutralizantes para febre amarela em nove (100%) das gestantes com desfecho grave, em 16 (80%) com desfecho moderado ($0,62 < 0,78 < 0,99$; 95%) e em 26 (96,3%) das que nenhum desfecho adverso foi evidenciado, mas nestas últimas, a titulação dos anticorpos foi mais elevada. Os nossos dados sugerem que a presença de anticorpos neutralizantes antiamarílicos não protegeu as gestantes de eventos adversos graves causados pelo Zika vírus, mas um título elevado destes pode ter influenciado na gravidade do desfecho.

Palavras Chaves: Doença exantemática na gravidez, ZikaVírus, anticorpos antiamarílicos, PRNT, eventos adversos da gravidez, Vacina para Febre Amarela.

ABSTRACT

Zika fever is an infectious febrile disease with symptoms similar to those caused by other arboviruses, but it can cause congenital alterations when transmitted from the infected mother to the fetus. In the 2016 Zika Virus epidemic, studies suggested a difference in the regional distribution of the Congenital Syndrome, raising the hypothesis that in areas of Yellow Fever transmission where vaccination coverage is high, such as in the Amazon region, it could have cross-protection. In order to describe the relationship between anti-yellow antibodies and pregnancy outcome, a study was carried out in pregnant women with exanthematous disease who had an acute Zika virus infection confirmed by RT-PCR. Anti-yellow antibodies were measured by PRNT and were considered serious pregnancy outcomes when there was fetal loss, stillbirth or microcephaly in the newborn; moderate outcome, when there was preterm delivery, low birth weight and/or intrauterine growth retardation, and no unwanted outcome, when none of these events were identified. A total of 56 pregnant women were included, nine of them (16.1%) had a severe outcome, 20 (35.7%) had a moderate outcome and 27 (48.2%) had no evidence of an adverse outcome at birth. The severe outcome was more frequent among pregnant women who had the infection in the first trimester of pregnancy. Neutralizing antibodies to yellow fever were evidenced in nine (100%) of the pregnant women with a severe outcome, in 16 (80%) with a moderate outcome ($0.62 < 0.78 < 0.99$; 95%) and in 26 (96, 3%) of which no adverse outcome was evidenced, but in the latter, the antibody titer was higher. Our data suggest that the presence of neutralizing antibodies against yellow fever did not protect pregnant women from serious adverse events caused by Zika virus, but a high titer of these may have influenced the severity of the outcome.

Keywords: Exanthematous disease in pregnancy, ZikaVirus, anti-yellow antibodies, PRNT, adverse events of pregnancy, Yellow Fever Vaccine.

RESUMO LEIGO

A febre do Zika é uma doença infecciosa, não contagiosa com sinais e sintomas parecidos com outros vírus transmitidos por mosquitos. É uma enfermidade que pode gerar problemas neurológicos e complicações sérias ao serem passadas ao bebê. A vacinação contra a Febre amarela é recomendada em quase todo o Brasil e promove uma proteção duradoura. A Amazônia brasileira é considerada uma região de alto risco para a transmissão da Febre amarela, e a décadas a vacina é aplicada nessa população, o que não ocorria na região nordeste, onde houve muitos casos de Zika. Estudos mostram que existem possibilidades de determinadas vacinas protegerem o indivíduo contra infecções ou apresentações graves de doenças ocasionada por outros vírus. O estudo teve como objetivo relacionar e descrever os níveis de anticorpos de febre amarela com o resultado da gestação, em mulheres que apresentaram infecção aguda pelo vírus da Zika durante a gravidez, no período de 01/2016 a 12/2016. Foram avaliadas na maioria, mulheres com 24 anos de idade e casadas. Dentre os resultados apresentados pelas crianças, grande parte não apresentou efeito adverso ao nascer. Na avaliação da quantidade de anticorpos, as mulheres que obtiveram baixa taxa de anticorpos tiveram crianças que apresentaram manifestações graves, assim como o moderado, porém não foi significativo. Mulheres que tiveram alta quantidade de anticorpos apresentaram a maioria das crianças sem alteração no nascimento. A manifestação grave da doença (ZIKV) nos bebês foram mais frequentes quando houve a infecção no primeiro trimestre da gestação, e os que não apresentaram alteração ao nascer, tiveram uma maior frequência no terceiro trimestre da gestação. O estudo mostrou que a presença de anticorpos de febre amarela não influenciou nas manifestações graves ocasionadas pelo vírus da Zika na gravidez. Possivelmente, devido a vacinação dessas mulheres ocorrerem nos primeiros anos de vida e a quantidade de anticorpos diminuir com o passar dos anos.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Organização do genoma e processamento de proteínas do Zika. (A) Processamento de poliproteína e clivagem de produtos. (B) Topologia da poliproteína na membrana. Fonte: Adaptado de SHI e GAO, 2017..... 2
- Figura 2** Reconstrução bayesiana do padrão de propagação espaço-temporal do ZIKV. As redes de transmissão durante os surtos de ZIKV, assim como sua origem e propagação, são exibidas pela análise de árvore de abrangência mínima (MST). Os países e os nós foram coloridos seguindo a legenda do continente (a). A análise DensiTree mostra a frequência de clados e nós da abordagem bayesiana. Ramos bem suportados são indicados por cores sólidas. As seqüências em negrito indicam microcefalia associada ao ZIKV e as em itálico indicam que o ZIKV foi importado da Venezuela para a China (b). Árvore filogenética do MCC bayesiano em escala temporal de seqüências genômicas completas de ZIKV que impõem um relógio molecular relaxado. Os retângulos azul e amarelo mostram dois clados monofiléticos bem suportados que ajudam a elucidar a dinâmica e a disseminação do ZIKV para diferentes países. Os algarismos romanos na frente dos retângulos amarelos representam nossa hipótese para diferentes variantes do ZIKV que circulam atualmente na América do Sul. As barras azuis horizontais na árvore indicam a incerteza filogenética e os asteriscos os valores de probabilidade posterior maiores ou iguais a 98% (c). Fonte: Adaptado de Campos et al. 2018. 4
- Figura 3** Mapa de rotas dos arbovírus avaliados no estudo. As cores e as setas destacam as rotas de entrada de DENV, CHIKV e ZIKV para a América do Sul continental. No canto inferior esquerdo, há um resumo das rotas traçadas no estudo. Abreviações: ARG: Argentina; BRA: Brasil; BVI = Ilha Virgem Britânica; CHI: CACIs: ilhas da América Central e do Caribe; China; COL: Colômbia; DOM: República Dominicana; FSM: Estados Federados da Micronésia; HTI: Haiti; IND: Índia; KHM: Camboja; MTQ: Martinica; Pls: Ilhas do Pacífico; PER: Peru; PHL: Filipinas; PRI: Porto Rico; PRY: Paraguai; PYF: Polinésia Francesa; SA: América do Sul; ATQ: Tailândia; TTO: Trinidad e Tobago; VEN: Venezuela. Fonte: Adaptado de Campos et al.2018. ... 5
- Figura 4** Ciclo de transmissão do Zika vírus. Ciclo de transmissão enzoótico entre primatas não-humanos e certas espécies de mosquitos *Aedes* em florestas. Ciclo de transmissão humano-mosquito-humano em área urbana, envolvendo principalmente mosquitos *A. aegypti*. Fonte: Adaptado de CDC, PLOS, Reuters..... 6
- Figura 5** Áreas endêmicas do vírus da febre amarela (YFV) e distribuição epidemiológica de surtos de febre amarela (FE) desde 1950. Adaptado de Douan et. al 2018. 10
- Figura 6** Casos humanos e epizootias em primatas não humanos de Febre Amarela silvestre por município de infecção ou de ocorrência, Brasil, 1998/1999 a 2018/2019..... 10
- Figura 7** Ciclo de transmissão Silvestre e Urbano. Fonte: folha.uol.com.br 12
- Figura 8** Patogênese da Febre Amarela. Modelo esquemático do processo de patogênese induzida por YFV. Adaptado de Douam, F., & Ploss, A. (2018). 14

Figura 9 Coberturas vacinais acumuladas para a vacina da Febre Amarela por município, Brasil, 2005-2014. Fonte: CGPNI/DEVIT/SVS/MS; Sinan; CGDT/DEVIT/SVS/MS. 17

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

ARG - Argentina

ATQ - Tailândia

BRA - Brasil

Bst DNA – DNA Polimerase *Bacillus stearotherophilus* (do inglês “*Bacillus stearotherophilus* DNA Polymerase”)

BVI - Ilha Virgem Britânica

C - Proteína do capsídeo

CACIs - ilhas da América Central e do Caribe

CHIKV - Chikungunya Vírus

COL - Colômbia

Ct – Ciclo Limiar (do inglês “Cycle Threshold”)

DENV - Dengue Vírus

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DOM - República Dominicana

E - Proteína do Envelope

ESPIN - Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional

Fab - Fragmento de união ao antígeno (do inglês “fragment antigen-binding”)

Fc - Fragmento Cristalizável (do inglês “fragment crystallizable”)

FSM - Estados Federados da Micronésia

FVS-AM – Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas

HTI - Haiti

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

IND - Índia

JEV - Vírus da encefalite japonesa

Kb - Kilobases

KHM - Camboja

MAC-ELISA – Teste Imunoenzimático de captura de imunoglobulina de classe M (do inglês “Immunoenzymatic assay to capture IgM antibodies”)

MST – Árvore de Abrangência Mínima (do inglês “Minimum spanning tree”)

MTQ - Martinica

ORF - Janela de Leitura Aberta (do inglês “Open Reading Frame”)

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PER - Peru

PIs - Ilhas do Pacífico

PHL - Filipinas

POC - Point of care

PRI - Porto Rico

prM - Proteína de Membrana

PRNT - Testes de neutralização por redução de placa

PRY - Paraguai

PYF - Polinésia Francesa;

qPCR-RT - Reação da Cadeia em Polimerase em Tempo Real

RNA - Ácido Ribonucleico

SA - América do Sul

SCZ - Síndrome Congênita do Zika

STORCH - Sífilis, Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus, Herpes simples

TTO - Trinidad e Tobago

VEM - Venezuela

WNV - Vírus do Oeste do Nilo

YFV - Vírus da Febre Amarela

UTR - Região não traduzida (do inglês “untranslated region”)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A Febre do Zika	1
1.1.2 O Vírus da ZIKA	1
1.1.3 Epidemiologia	2
1.1.4 Transmissão	5
1.1.5 Zika na Gestação	6
1.1.6 Diagnóstico	7
1.1.7 Tratamento e Prevenção	8
1.2 Febre Amarela	8
1.2.1 Estrutura do YFV	11
1.2.2 Transmissão	11
1.2.3 Patogênese	13
1.2.4 Diagnóstico	14
1.2.5 Tratamento e Prevenção	15
1.2.6. A Vacina Antiamarílica	16
1.2.7 Imunidade Cruzada	18
1.3 Justificativa	19
2. OBJETIVOS	21
2.1 Geral	21
2.2. Específicos	21
3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO	22
4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS FUTURAS	36
5. CONCLUSÃO	36
6. APÊNDICES	45
6.1 Manipulação de Células de Cultura	45
6.2 Infecção de células Vero	48
6.3 Titulação Viral em Placa de 6 Poços	52
6.4 Teste de Neutralização por Redução de Placa (PRNT)	57
7. ANEXOS	66
7.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	66

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Febre do Zika

É uma doença infecciosa febril aguda, não contagiosa semelhante a outros arbovírus como dengue, febre amarela e febre do nilo. A infecção gera na maioria dos casos relatados, sintomas leves que podem durar de dois a sete dias, incluindo exantema, febre baixa, conjuntivite sem secreção, prurido, poliartralgia, cefaleia e edema (1,2). Em gestantes o vírus pode ser transmitido para o feto, ocasionando complicações neurológicas, anomalias ou acarretar óbito fetal, como a síndrome congênita do Zika ou abortos espontâneos. (3,4).

1.1.2 O Vírus da ZIKA

Foi isolado pela primeira vez, no sangue de primatas não humanos em abril de 1947 na floresta de Zika, em Uganda no continente Africano, durante um estudo vetorial responsável pelo ciclo silvestre da Febre Amarela, no qual testes de neutralização confirmaram a presença de um vírus diferente (5,6).

É ocasionada por um *Flavivirus*, da família *Flaviviridae* agrupado ao sorogrupo *Spondweni*, com simetria icosaédrica de 50-60nm de diâmetro. Composto de 10.794 pares de bases, possui RNA de fita simples, polaridade positiva, com aproximadamente 11 kilobases (kb). O genoma do vírus codifica a síntese de três proteínas estruturais (Pré membrana [prM], Capsídeo [C] e Envoltório [E]), responsáveis por formar a partícula viral e a organização da estrutura do envelope, além de sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) capazes de emitir virulência, replicação, mecanismos de reconhecimento determinantes para a patogênese, estabilização do genoma, tradução e empacotamento do RNA (1,7–10) (FIGURA1).

As análises filogenéticas mostram que o vírus possui duas linhagens distintas: asiática e africana. Originaram-se na África Oriental, sendo que a linhagem asiática surgiu durante a migração do vírus da África para o sudeste da Ásia. No início de 2015 foram detectados casos de infecção dessa cepa no Brasil e análises de

sequências genômicas mostraram que estava relacionado ao isolado de 2013 da Polinésia Francesa. Estudos recentes de filogenia revelaram que o genótipo predominantemente encontrado nas Américas é da linhagem asiática (11,12).

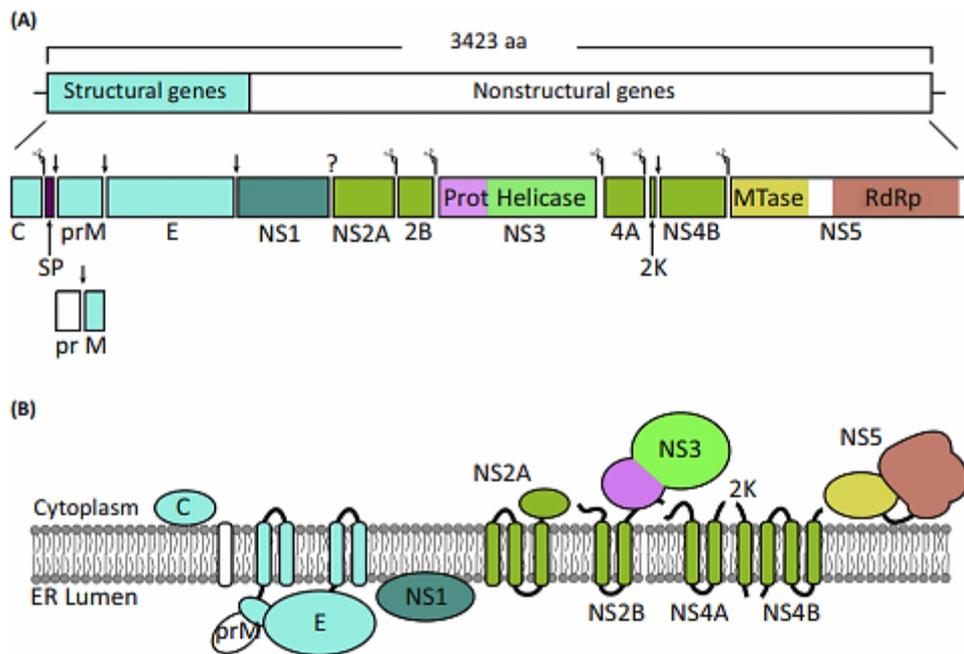


Figura 1 Organização do genoma e processamento de proteínas do Zika. (A) Processamento de poliproteína e clivagem de produtos. (B) Topologia da poliproteína na membrana. Fonte: Adaptado de SHI e GAO, 2017.

1.1.3 Epidemiologia

Os primeiros casos relatados do vírus em humanos ocorreu em 1954 na Nigéria, confirmada pelo isolamento viral e a detecção de anticorpos neutralizantes do ZIKV. A doença ganhou relevância com um número de casos elevados nas ilhas de Yap, um dos Estados Federados da Micronésia no ano de 2007, com cerca de 73% (5005 dos 6892 residentes) da população infectada, no qual relataram um surto com sintomatologia semelhante ao Dengue, em razão de já terem enfrentado surtos desse vírus nos anos de 1995 e 2004 (13–15).

Em 2013 na Polinésia Francesa o surto atingiu todos os arquipélagos (67 ilhas distribuídas em cinco arquipélagos). Estima-se que 11% da população tenha procurado indicação médica para a suspeita da doença. Sendo que a grandiosidade do surto provavelmente ocorreu devido ao baixo nível de imunidade do ZIKV na população, e alta densidade de vetores presentes na região, visto que o DENV era o único vírus relatado como o causador das infecções desde a década de 1960 e, nos anos de 2011-2013, a circulação autóctone do Ross River (16–18).

O vírus foi disseminado para outras ilhas abrangendo Nova Caledônia, ilhas Cook e de Páscoa, com cepas de Zika filogeneticamente relacionadas às identificadas na Polinésia (19–21). A primeira transmissão autóctone no Brasil ocorreu no início de 2015 na região nordeste do país, com características clínicas semelhantes à síndrome da dengue e em dezembro desse mesmo ano o Ministério da Saúde estimou 440.000 a 1.300.000 casos suspeitos de Zika (22–24). Foram relatados mais de 4000 casos suspeitos de microcefalia até fevereiro de 2016, que de acordo com esses dados, estudos retrospectivos realizados na Polinésia evidenciaram aumento no números de casos de microcefalia e outras anormalidades fetais durante o surto de 2013-2014 (25–27).

Com relação a expansão geográfica do vírus um estudo baseado em dados filogenéticos evidenciaram que o Zika percorreu a mesma rota que outros arbovírus epidêmicos humanos nas Américas (DENV, ZIKV e CHIKV),(FIGURA 2).Tendo como principal porta de entrada a América Central e Caribe (FIGURA 3) (28).

Em novembro de 2015, o Brasil declara uma Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN), e em fevereiro de 2016 Internacional, devido às complicações neurológicas relatadas durante o período de epidemia. (29). A doença ganhou relevância no final de 2015 com o aumento do número de casos de microcefalia, apresentando possibilidade para uma transmissão vertical devido à notificação prestada pelo Ministério da Saúde, revelando vinte vezes mais casos relatados. Sendo posteriormente comprovada com a detecção do vírus no líquido amniótico de fetos com microcefalia (30).

A entrada do vírus Zika no Amazonas, ocorreu em outubro de 2015, quando foram notificados 159 casos suspeitos da doença. Em 2016 houve o aumento

expressivo no número de notificações com 6.090 casos suspeitos, dos quais 95% foram em residentes de Manaus (31). Nesse mesmo período foram notificados 1.015 casos em mulheres grávidas com 356 confirmações laboratoriais (32).

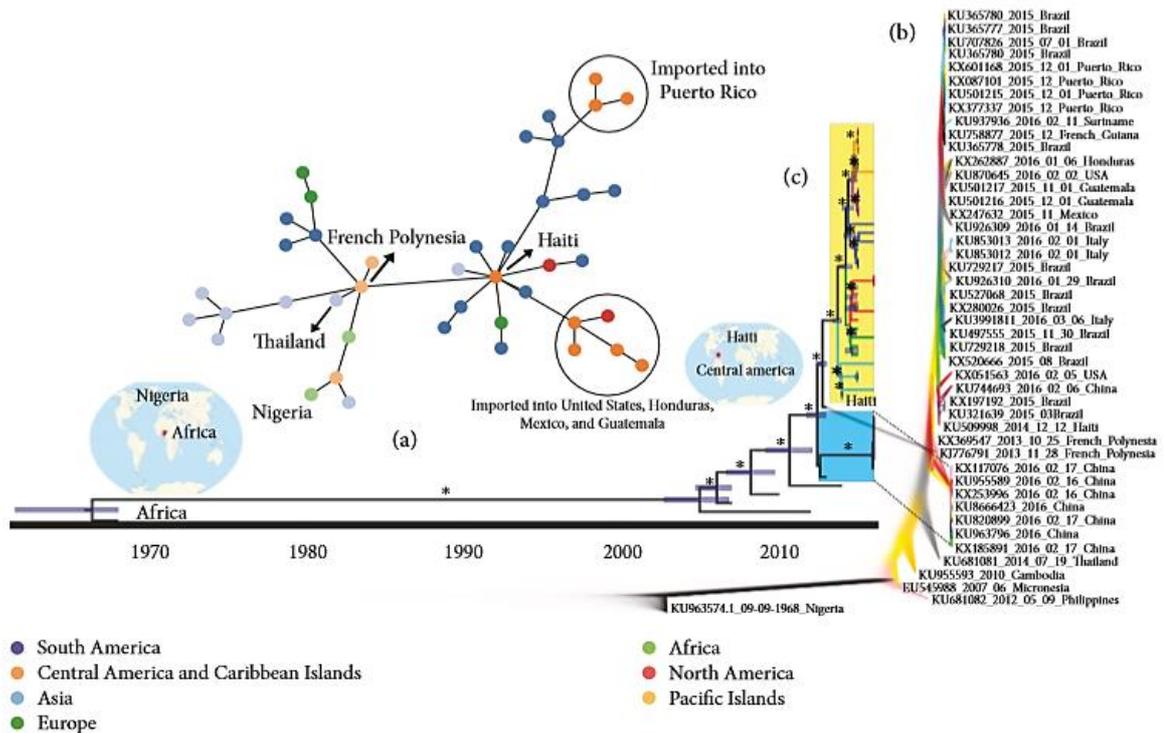


Figura 2 Reconstrução bayesiana do padrão de propagação espaço-temporal do ZIKV. As redes de transmissão durante os surtos de ZIKV, assim como sua origem e propagação, são exibidas pela análise de árvore de abrangência mínima (MST). Os países e os nós foram coloridos seguindo a legenda do continente (a). A análise DensiTree mostra a frequência de clados e nós da abordagem bayesiana. Ramos bem suportados são indicados por cores sólidas. As seqüências em negrito indicam microcefalia associada ao ZIKV e as em itálico indicam que o ZIKV foi importado da Venezuela para a China (b). Árvore filogenética do MCC bayesiano em escala temporal de seqüências genômicas completas de ZIKV que impõem um relógio molecular relaxado. Os retângulos azul e amarelo mostram dois clados monofiléticos bem suportados que ajudam a elucidar a dinâmica e a disseminação do ZIKV para diferentes países. Os algarismos romanos na frente dos retângulos amarelos representam nossa hipótese para diferentes variantes do ZIKV que circulam atualmente na América do Sul. As barras azuis horizontais na árvore indicam a incerteza filogenética e os asteriscos os valores de probabilidade posterior maiores ou iguais a 98% (c). Fonte: Adaptado de Campos et al. 2018.

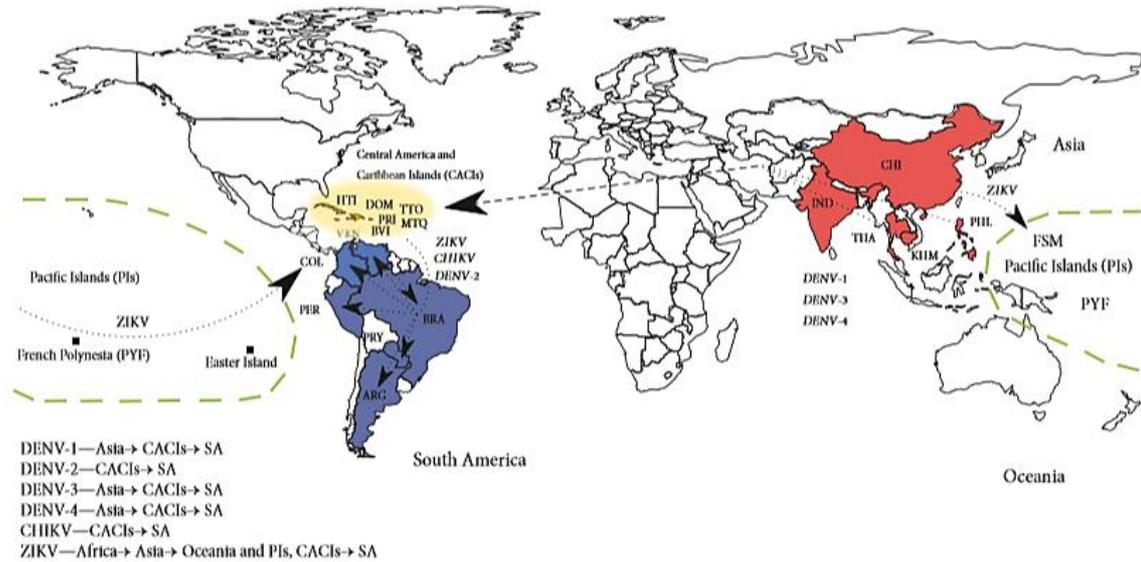


Figura 3 Mapa de rotas dos arbovírus avaliados no estudo. As cores e as setas destacam as rotas de entrada de DENV, CHIKV e ZIKV para a América do Sul continental. No canto inferior esquerdo, há um resumo das rotas traçadas no estudo. Abreviações: ARG: Argentina; BRA: Brasil; BVI = Ilha Virgem Britânica; CHI: CACIs: ilhas da América Central e do Caribe; China; COL: Colômbia; DOM: República Dominicana; FSM: Estados Federados da Micronésia; HTI: Haiti; IND: Índia; KHM: Camboja; MTQ: Martinica; PIs: Ilhas do Pacífico; PER: Peru; PHL: Filipinas; PRI: Porto Rico; PRY: Paraguai; PYF: Polinésia Francesa; SA: América do Sul; ATQ: Tailândia; TTO: Trinidad e Tobago; VEN: Venezuela. Fonte: Adaptado de Campos et al.2018.

1.1.4 Transmissão

O surgimento do ZIKV no Brasil foi de grande impacto, devido a ampla distribuição de vetores (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*) dispersos pelo país, principalmente em áreas de extensa urbanização, com saneamento básico precário e falta de controle efetivo do vetor. Outros fatores como alterações genéticas, adaptação a novos hospedeiros e viagens são de grande importância para a propagação geográfica do vírus (22,33,34).

O ZIKV, assim como outros Flavivírus são transmitidos principalmente por mosquitos, do gênero *Aedes* (*Stegomyia*), sendo a fonte mais comum de disseminação do vírus.(35). Na África, o ciclo de transmissão silvestre (enzoótico) envolvem primatas não humanos e mosquitos arbóreos, bem como outras espécies que também atuam como vetores na transmissão viral (*Aedes africanus*, *Aedes*

albopictus, *Aedes vittatus*, *Aedes furcifer*, *Aedes hensilli* e *Aedes luteocephalus*) (36–39) (Figura 4). Em áreas urbanas a disseminação ocorre em um ciclo humano-mosquito-humano, que pode ser mediada por duas espécies: *A. aegypti* e *A. albopictus* (este em menor proporção), sendo ambos responsáveis por surtos acometidos pelo ZIKV, embora em outras regiões como na Ilha de Yap e Polinésia Francesa os principais vetores tenham sido das espécies *A. hensilli* e *A. polynesiensis* (40) (Figura 4).

Outras vias de transmissão como a sexual e a presença viral em secreções vaginais, leite materno, sêmen e anal, além da infecção intra-uterina que ocorre de mãe para o feto durante a gestação já são relatadas. (41–44). Em transfusão de sangue ainda não foi confirmada (45,46).

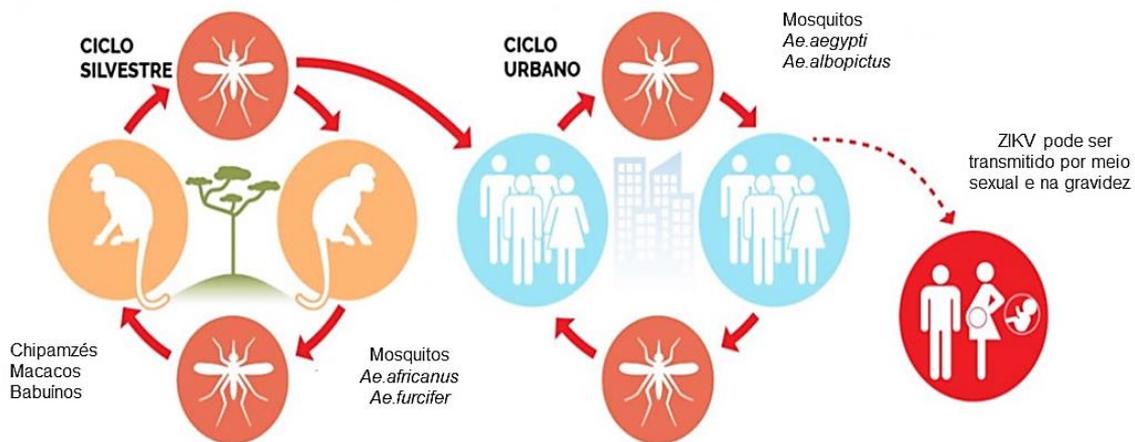


Figura 4 Ciclo de transmissão do Zika vírus. Ciclo de transmissão enzoótico entre primatas não-humanos e certas espécies de mosquitos *Aedes* em florestas. Ciclo de transmissão humano-mosquito-humano em área urbana, envolvendo principalmente mosquitos *A. aegypti*. Fonte: Adaptado de CDC, PLOS, Reuters.

1.1.5 Zika na Gestação

Uma das principais características dessa infecção é a predileção pelo sistema nervoso central impedindo o desenvolvimento neuronal normal, acarretando risco ao

bebê, no qual o vírus é capaz de transitar pela barreira placentária afetando o desenvolvimento cerebral em fetos (47,48). Os Flavivírus em geral que possuem predileção pelo sistema nervoso central como WNV, JEV e ZIKV, podem causar patologias envolvendo mielite, encefalite, convulsões e danos cerebrais permanentes. Outras como a síndrome de Guillain-Barré, são ocasionadas devido à resposta imune do indivíduo à infecção (49,50).

Durante a epidemia de Zika, foi observado uma possível associação do vírus ao aumento na incidência da síndrome congênita no recém-nascido. Tornando-se, um dos principais impactos ocasionado pela infecção do ZIKV durante a gravidez. A síndrome congênita do Zika, possui um espectro clínico que pode variar de leve a grave com um padrão de deficiência encontrado em fetos (51)(52).

A microcefalia é uma das manifestações mais marcantes da síndrome congênita do Zika. O maior risco dessa malformação ocorre principalmente durante o primeiro trimestre da gravidez que abrange distúrbios congênitos incluindo espasticidade, disfunção tronco cerebral, neuroimagem anormal apresentando calcificações, malformações corticais, hipoplasia do troco cerebral, ventriculomegalia, além de outras manifestações envolvendo convulsões e distúrbios visuais devido a lesões maculares e perimaculares bilaterais, assim como anormalidades do nervo óptico (48,53,54).

1.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial é baseado na detecção direta do vírus, levando em consideração o tempo de doença recorrido, podendo ser adotado a técnica da Reação em cadeia da Polimerase (PCR) convencional ou a Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), que possibilita a detecção do gene através de sequências alvo do DNA, de acordo com a intensidade da fluorescência emitida no produto a ser amplificado, gerando um gráfico que indicará o resultado de acordo com o limiar de detecção denominado de Cycle Threshold (Ct), viabilizando o resultado exposto em uma curva de amplificação (55).

Os testes sorológicos têm por objetivo a identificação de anticorpos, sendo o teste imunoenzimático de captura de imunoglobulina da classe M (Mac-ELISA) e kits comerciais para Zika que são utilizados para a detecção qualitativa, através de anticorpos IgM. No entanto há evidências de reação cruzada com outros Flavivírus, o que interfere diretamente na confiabilidade do teste, e que possibilita resultados falso positivo (56). Outra metodologia são os testes de neutralização por redução de placas – PRNT, um ensaio que se baseia na quantificação indireta de anticorpos neutralizantes contra um vírus específico. É considerado um método de referência para a análise de respostas imunes protetoras após a vacinação, pois é um teste mais sensível e específico, porém não é utilizada em rotinas, devido à necessidade de equipe qualificada, equipamentos, alto custo e tempo (57). Exames de imagem como ultrassom, tomografia ou ressonância magnética são realizados em recém-nascidos com suspeitas de comprometimento neurológico (58).

1.1.7 Tratamento e Prevenção

Não existe medicação ou vacina específica antiviral para a infecção do vírus Zika. A orientação é baseada de acordo com as evidências, por exemplo, é indicado acetaminofeno para pacientes que apresentarem febre ou queixa de dores e anti-histamínico para exantema pruriginoso, além de repouso e ingestão de líquido para evitar a desidratação (34). As medidas de prevenção incluem a utilização de calças compridas, roupas de cores claras, repelentes de insetos, mosquiteiros, além das estratégias comunitárias para a eliminação de possíveis locais para reprodução do mosquito (45).

1.2 Febre Amarela

A Febre Amarela foi uma das enfermidades infecciosas mais graves e de alta mortalidade nos séculos XVIII e XIX na América e permanece sendo uma doença de grande importância na saúde pública. Principalmente em áreas endêmicas, no qual

abrange na maior parte florestas tropicais da África e América do Sul onde ocorrem surtos isolados ou epidemias (59).

O primeiro relato da Febre Amarela foi encontrado em um manuscrito Maia, no ano de 1648. Pela análise da sequência do genoma, o vírus aparenta ter evoluído de outros vírus transmitidos por mosquitos há 3000 anos, principiado na África e importado para as Américas durante o tráfico negreiro (60)(61). O pânico da doença era resultante da dificuldade de distingui-la de outras enfermidades tropicais como malária e dengue, além da crença de que a doença era transmitida pelo ar. Em 1900, o médico Walter Reed, da Comissão de Febre Amarela do Exército dos Estados Unidos demonstrou através de experimentos em voluntários humanos, que a infecção era transmitida pelo mosquito ao homem. Desde então, diversas campanhas foram realizadas a fim de combater o vetor em lugares no qual a Febre Amarela era considerada um problema de saúde pública (62) .

No Brasil a primeira epidemia descrita, ocorreu em 1685 na cidade de Recife (59). Entre 1928 e 1929 o Rio de Janeiro enfrentou uma epidemia com mais 700 casos e mais de 400 mortes. Com a implementação da campanha de vacinação, em 1955 o Brasil assim como outros países sul-americanos conseguiram eliminar o *Aedes aegypti* do seu território, no qual ressurgiu entre os anos de 1967-1976. Entre 1990 e 1993 todos os casos de infecção registrado no Brasil ocorreram nas regiões norte, centro-oeste e nordeste (63).

Existem cerca de 80.000 a 200.000 casos de febre amarela no mundo, com número de fatalidade estimada entre 30.000-60.000, e uma taxa de letalidade que varia entre 20-60%(64). A FA silvestre é endêmica na Região Amazônica, que abrange parte da América do Sul e está presente ativamente no continente Africano. São registrados ocasionalmente períodos epizoóticos/epidêmicos, caracterizando as reemergências do vírus nos países. Os surtos geralmente ocorrem, quando existem condições favoráveis a transmissão, como temperaturas elevadas, pluviosidade, densidade de vetores, hospedeiros primários e baixa cobertura vacinal. O episódio mais recente, ocorreu entre 2008-2018 na região Extra- Amazônica, que alcançou áreas de domínio de Mata Atlântica atingindo populações não imunizadas ao vírus (Figura.5 e 6) (65).

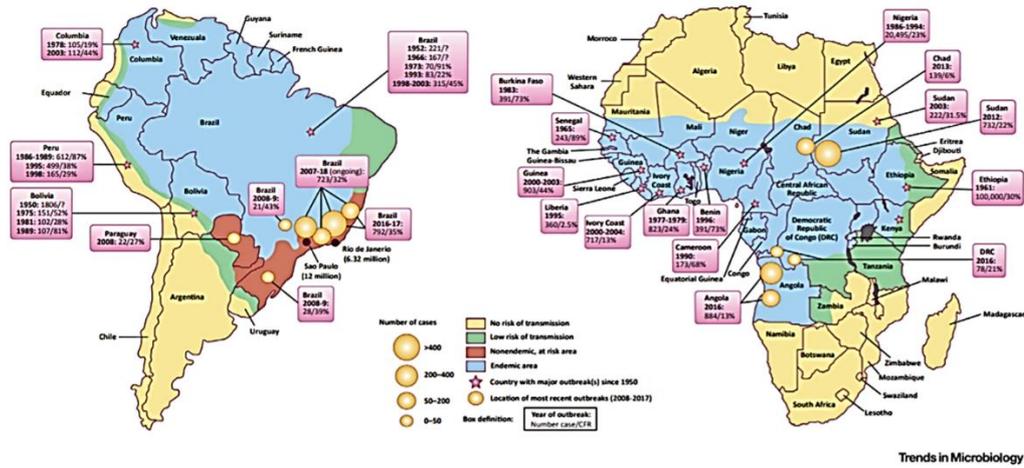


Figura 5 Áreas endêmicas do vírus da febre amarela (YFV) e distribuição epidemiológica de surtos de febre amarela (FE) desde 1950. Adaptado de Douan et. al 2018.

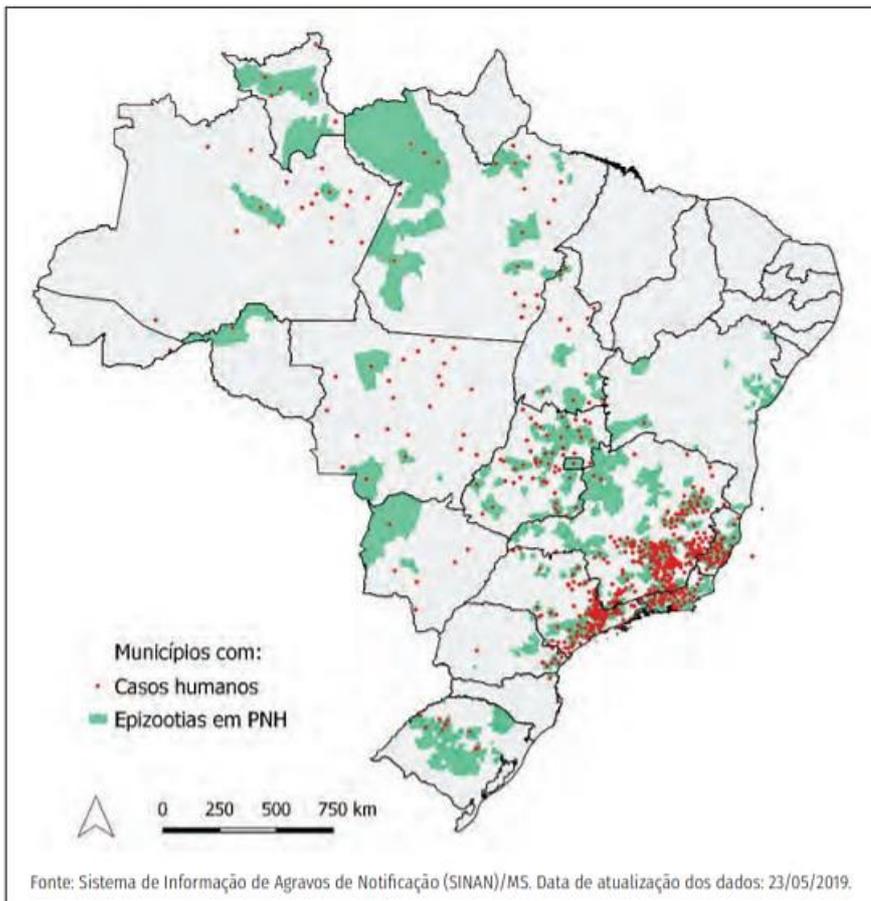


Figura 6 Casos humanos e epizootias em primatas não humanos de Febre Amarela silvestre por município de infecção ou de ocorrência, Brasil, 1998/1999 a 2018/2019.

1.2.1 Estrutura do YFV

O vírus da Febre Amarela pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, e é composta por pelo menos 70 espécies de vírus, responsáveis por uma variedade de doenças ocasionadas em homens e animais. São vírus esféricos, envelopados, que medem de 40-60 nm de diâmetro. Possui um capsídeo icosaédrico, contendo um RNA de fita simples, polaridade positiva e com aproximadamente 11 kb. É composto de um genoma com 10.862 nucleotídeos e uma região codificante, possuindo cerca de 10.233 nucleotídeos capazes de formar proteínas virais estruturais e não-estruturais na ordem 5'-C-prM-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5-3' (66–68). As regiões não codificantes são importantes para a regulação e expressão do vírus. O RNA mensageiro e tradutor promovem a síntese de uma poliproteína de 3411 aminoácidos que resulta em 10 polipeptídeos virais específicos. A proteína C junto com o RNA formam o capsídeo viral e a glicoproteína pré-M, que é precursora da proteína estrutural, e a proteína E origina o envelope. As proteínas estruturais são formadoras da estrutura básica da partícula viral e são responsáveis pela reação do organismo frente a uma infecção. As proteínas não estruturais são responsáveis pelas atividades reguladoras e de expressão do vírus como replicação, virulência e patogenicidade (67).

1.2.2 Transmissão

Através de diferentes vetores hematófagos, as três possíveis formas de transmissão evidenciadas na transmissão do vírus da Febre Amarela são a silvestre, intermediária e urbana. Sendo as predominantes no território brasileiro as transmissões silvestres e urbanas (Figura 7). A Febre Amarela Silvestre ocorre em florestas tropicais, tendo os macacos como os principais reservatórios do vírus amarelo, no qual a serem picados por mosquitos do gênero *Haemagogus* (*H.janthinomys*, *H. albomaculatus*), e *Sabethes* (*S.chloropterus*) transmitem o vírus para outros primatas não humanos, principalmente do gênero *Allouata*(macaco guariba), *Cebus* (macaco prego), *Atelles* e *Callithrix*. A infecção em humanos

decorre da entrada do vírus em áreas de ciclo enzoótico natural, onde são picados e desenvolvem a doença. A Febre Amarela Intermediária, geralmente ocorre no continente africano, que se reproduz tanto na natureza quanto ao redor das famílias, infectando primatas não humanos e indivíduos da região. A Febre Amarela Urbana, decorre quando a pessoa infectada, introduz o vírus em áreas de elevado número populacional, com alta densidade de mosquitos *Aedes aegypti* proporcionando o desenvolvimento da doença em indivíduos não imunes, e tornando viável a transmissão do vírus a pessoa (69,70).

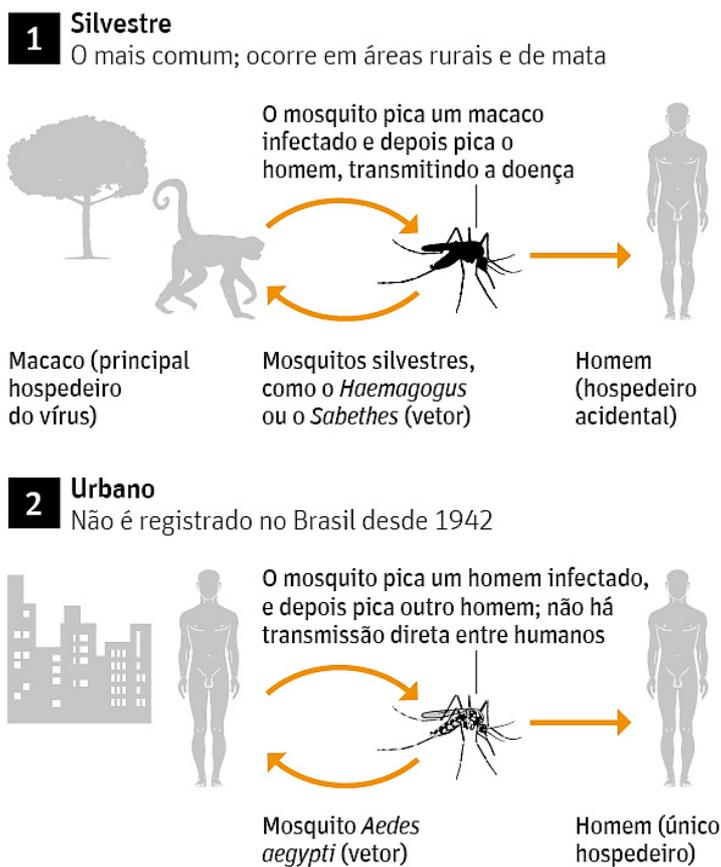


Figura 7 Ciclo de transmissão Silvestre e Urbano. Fonte: folha.uol.com.br

1.2.3 Patogênese

O desenvolvimento da doença no indivíduo, acontece após a introdução do vírus amarelo na circulação do indivíduo. As partículas virais atingem linfonodos, células linfóides e macrófagos, que posteriormente são levadas pelos vasos linfáticos até a corrente sanguínea e fígado. O período de viremia varia de acordo com a apresentação clínica, desde formas leves, no qual são apresentadas em 90% dos casos, resultando em febre, cefaleia e mal-estar. Após a remissão, alguns pacientes podem evoluir para sintomas mais severos da doença como febre hemorrágica, trombocitopenia, icterícia, insuficiência hepática e renal, podendo desencadear a uma disfunção generalizada e morte (71). O YFV possui tropismo por células do fígado, que induzem apoptose e necrose dos hepatócitos, que ao ser combinado com a esteatose resulta na diversidade de danos no tecido hepático observados durante a infecção, além de lesões que podem ocorrer no coração, timo, rim e baço (Figura 8). O efeito citopático é sugerido devido a resposta imune, que gera uma reação desequilibrada de citocinas e promove fatores de hepatotoxicidade e a doença (64,71).

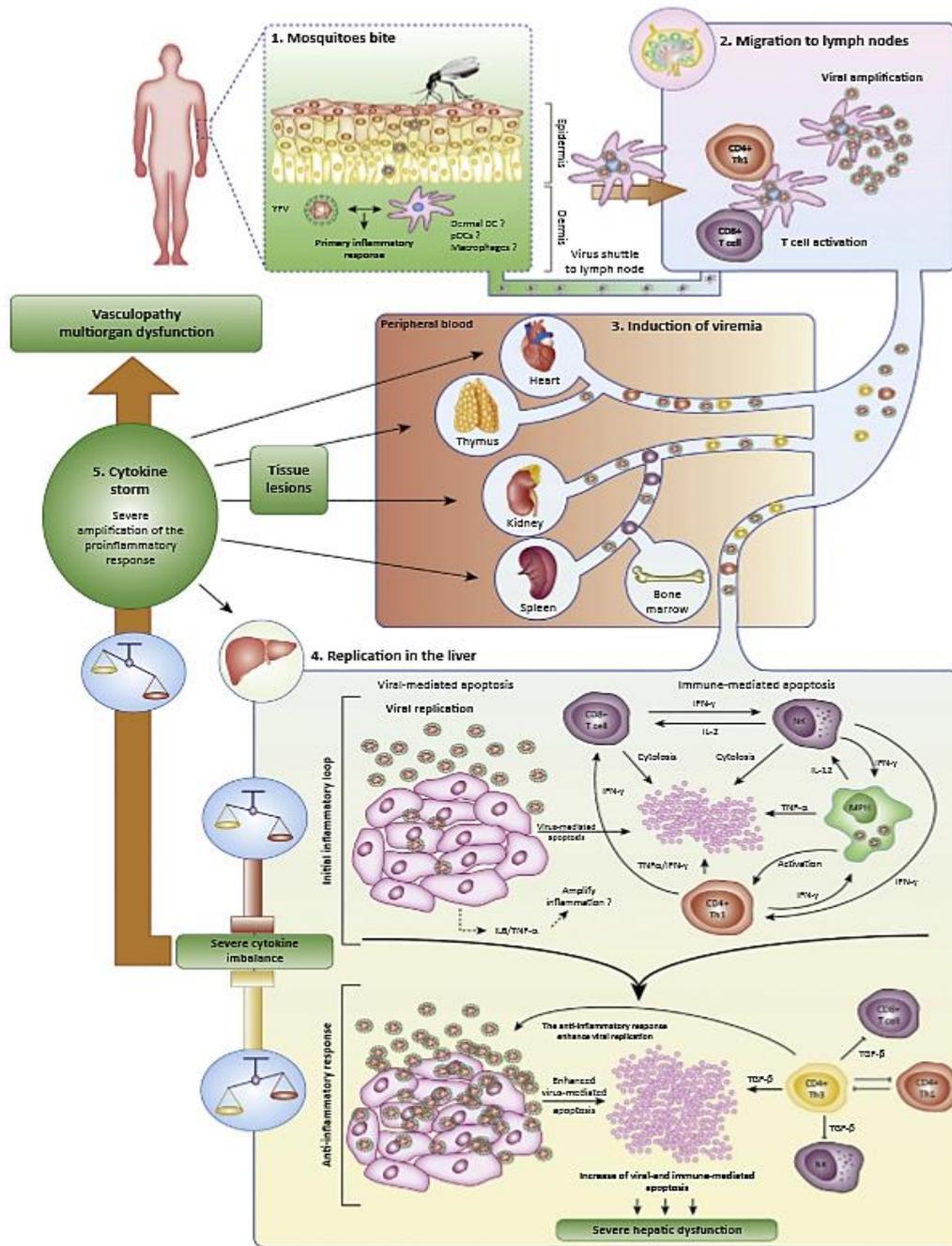


Figura 8 Patogênese da Febre Amarela. Modelo esquemático do processo de patogênese induzida por YFV. Adaptado de Douam, F., & Ploss, A. (2018).

1.2.4 Diagnóstico

É considerado um caso suspeito, o indivíduo com exposição em áreas de riscos ou ambientes silvestres com até sete dias de infecção aguda presente ou

relatada, acompanhada de dois ou mais sinais e sintomas (cefaleia, mialgia, calafrios, mal-estar, náuseas, icterícia), e que não possua comprovante de vacinação ou que tenha recebido a vacina há menos de 30 dias.

Caso confirmado, é relatado quando o indivíduo confirma positivo para a presença do vírus ou anticorpo, através do diagnóstico laboratorial. Os Exames laboratoriais inespecíficos auxiliam na identificação das formas mais graves e no manejo do paciente. O diagnóstico específico pode ser detectado pela forma direta, identificando o antígeno viral em amostras de sangue ou tecido, através da biologia molecular e isolamento viral. A forma indireta é realizada através de métodos sorológicos que detectam imunoglobulinas IgM indicando infecção recente e IgG a anticorpos de memória (70,72).

1.2.5 Tratamento e Prevenção

Não há medicação antiviral específica para a doença. O tratamento é apenas sintomático sob hospitalização, repouso e ingestão de líquidos (70). A vacinação é uma das formas mais eficazes para a prevenção da doença, sendo capaz de controlar surtos e evitar a transmissão em regiões epidêmicas (61).

Outras medidas de proteção indicadas em áreas de risco são: usar repelentes de insetos de acordo com as orientações do fabricante, proteger a pele com o uso de blusas e calças compridas, passar o maior tempo em áreas refrigeradas com portas e janelas fechadas ou protegidas por tela para impedir a entrada de mosquitos e dormir sob mosquiteiros, principalmente crianças menores de 6 meses que não podem receber vacina e fazer uso de repelentes. Outra medida de fundamental importância, é o controle de vetores, responsáveis pelo combate na disseminação do patógeno, na eliminação de criadouros de mosquitos em depósitos de água, como poços, fossas e caixas d'água além do controle químico com larvicidas e campanhas de saúde informando as medidas de combate (70).

1.2.6. A Vacina Antiamarílica

A vacina atenuada da Febre Amarela é produzida nacionalmente desde 1937 pela Biomanguinhos (Fiocruz) a partir da cepa 17DD derivada do vírus amarílico selvagem. A vacina é fabricada com extrato de embrião de frango infectado e é utilizada na prevenção da Febre Amarela em viajantes, imunização de crianças em áreas endêmicas e em emergência durante surtos. É administrada em um volume de 0,5 mL pela via subcutânea, em dose única, sendo um imunobiológico que possui uma resposta eficiente e segura contra o vírus, induzindo uma imunidade que persiste por no mínimo 10 anos, e possivelmente por toda a vida quando administrado a dose de reforço, possibilitando uma proteção duradoura de 90-98% (66). Os anticorpos protetores surgem entre o sétimo e o décimo dia após a aplicação da vacina, com relatos raros de eventos adversos (70).

A imunização aumenta diretamente a expectativa de vida e reduz a mortalidade, principalmente em mulheres grávidas no qual o risco de morbidade é mais frequente. A vacinação antes da gestação evita anomalias congênitas, aborto espontâneo, baixo peso ao nascer e parto pré-maturo. Além de promover formas assintomáticas ou leves da doença, em crianças cujas mães foram vacinadas e transmitiram (via transplacentária durante a gestação) anticorpos maternos (73).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP) existem recomendações com doses fracionadas da vacina. Levando em consideração os cuidados com crianças, podendo tomar aquelas com dois anos ou mais de idade, que não apresentem condições clínicas especiais, adolescentes, gestantes e mulheres que moram em áreas de risco e que estiverem amamentando crianças com menos de seis meses. No entanto o aleitamento deve ser suspenso por 10 dias após a imunização (74).

Dentre as contraindicações a vacina não é recomendada para crianças menores de seis meses de idade, indivíduos que fazem uso de medicações antimetabólicas ou modificadores do curso da doença, pacientes transplantados de

órgãos sólidos e indivíduos com doença oncológica em quimioterapia, radioterapia e portadores de doenças autoimunes (74).

No período de 2005-2014 havia uma extensa área de recomendação vacinal contra Febre Amarela para vários estados: Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Distrito Federal, Goiás, Tocantins, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Maranhão, Minas Gerais e parte dos Estados da Bahia, Piauí, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Figura 9) (75).

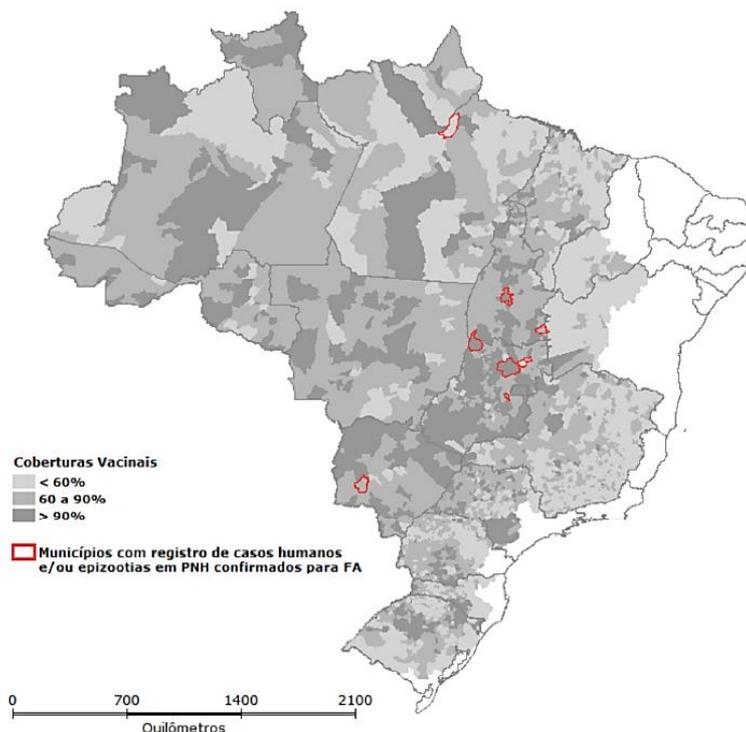


Figura 9 Coberturas vacinais acumuladas para a vacina da Febre Amarela por município, Brasil, 2005-2014. Fonte: CGPNI/DEVIT/SVS/MS; Sinan; CGDT/DEVIT/SVS/MS.

Com a intenção de ampliar a cobertura vacinal no Brasil, em 2020 o Ministério da Saúde recomendou um reforço da vacinação aos quatro anos de idade, pois embora uma dose seja capaz de imunizar o indivíduo por toda a vida, quando utilizadas em crianças muito novas (aos nove meses) pode comprometer a eficácia da vacina. Além disso, nem todos os estados eram considerados de risco epidemiológico ou prioritários para justificar a precisão de uma cobertura vacinal.

Agora todo o território nacional e mais de mil municípios do Nordeste brasileiro fazem parte da vacinação para Febre Amarela (76).

1.2.7 Imunidade Cruzada

Os Flavivírus, possuem a capacidade de conferir proteção imunológica cruzada após infecção a outros vírus da mesma família, o que dificulta o diagnóstico correto, sendo necessário a confirmação com outros testes específicos. Isso ocorre, quando a memória imunológica resultante de um combate a um patógeno conhecido pelo organismo, também age contra um novo vírus que possua semelhança com agente infeccioso anterior. Ou seja, consiste na capacidade de linfócitos B ou T que atuam na resposta adaptativa reconhecerem proteínas ou sequências de um patógeno e identificá-los em outro micro-organismo (77).

Um estudo realizado nos Estados Unidos evidencia uma proteção cruzada entre vírus relacionados antigenicamente pertencentes à mesma família a base de vacinação. No qual a vacina da encefalite japonesa inativada (JEV) adicionada a um adjuvante, que foi a vacina da Febre Amarela, forneceu um potente efeito que viabilizou estímulo aos fatores imunes inatos críticos promovendo uma proteção cruzada ao vírus do WNV (78). Outro estudo levantou a hipóteses de a vacina da febre amarela induzir uma proteção cruzada contra o vírus Zika. A pesquisa mostrou o efeito protetor do imunobiológico em camundongos imunocompetentes infectados com o ZIKV resultando na redução da mortalidade de camundongos e uma diminuição substancial na carga viral cerebral (79). Em outra literatura, notaram que a pré-imunidade à vacina da Febre Amarela pode aumentar o nível de anticorpos neutralizantes de reação cruzada duráveis contra os quatro sorotipos de Dengue em receptores humanos de uma vacina viva contra a dengue-2 (80).

Outros estudos evidenciam o efeito da proteção imunológica cruzada: O Bacillus Calmette-Guérin (BCG) é uma vacina atenuada utilizada na imunização contra a tuberculose e tem a capacidade de induzir uma imunidade treinada possibilitando uma proteção contra micro-organismos diferentes do Mycobacterium

tuberculosis (81). Alguns estudos realizados para o vírus da Covid-19 no qual utilizando diversos ensaios para anticorpos que reconhecem as proteínas SARS-CoV-2 foi detectado uma imunidade humoral pré-existente (77). Pesquisas relacionadas a Dengue demonstrada experimentalmente é notada a presença da imunidade pré-existente que é capaz de neutralizar e proteger contra a infecção do ZIKV, associando a uma redução na infecção e sintomas (82). Em relação aos efeitos adversos em nível populacional, um estudo brasileiro observou que em áreas com grandes epidemias de Dengue nos últimos seis anos obtiveram-se taxas mais baixas de microcefalia (83). E outro estudo de caso-controle realizado no Nordeste apresentou resultados sugestivos que a infecção por DENV multítípica tem ação de proteção em vez de aumentar, o desenvolvimento de síndrome congênita pelo vírus da Zika (84). Na Itália foi realizado um estudo entre cinco gestantes, no qual três eram imunologicamente reativas ao DENV-ZIKV e duas eram não reativas ao DENV. Os ensaios mostraram que a imunidade pré-existente em mães experimentadas ao Dengue pode desempenhar um papel de proteção cruzada não transmitindo ZIKV para o feto (85).

Outro estudo através de análises espaciais utilizando municípios brasileiros lançou a hipótese de que mulheres grávidas em regiões com cobertura vacinal contra febre amarela alta podem gerar filhos com um risco menor de desenvolver microcefalia (86).

1.3 Justificativa

A Amazônia brasileira é considerada há tempos área de potencial risco de infecção para Febre Amarela, e por décadas a vacina antiamarílica é utilizada em massa nessas populações. O que não acontecia em Estados de outras regiões brasileiras, principalmente no Nordeste. Nessa região, os dados epidemiológicos oficiais revelam uma intensa circulação do vírus Zika. E estudos recentes evidenciam a possibilidade de proteção cruzada tanto em patógeno quanto em vacina.

Diante desses cenários, o presente estudo foi desenvolvido a fim de estabelecer uma possível relação protetora entre titulação de anticorpos antiamarílicos e proteção contra desfechos adversos da gestação em mulheres com infecção por Zika, em uma região com imunização maciça contra Febre Amarela.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Relacionar e descrever os níveis de anticorpos antiamarílicos com o desfecho da gestação em mulheres que apresentaram infecção aguda pelo vírus da Zika durante a gestação.

2.2. Específicos

- Descrever fatores sociodemográficos da casuística;
- Descrever o desfecho da gestação;
- Avaliar títulos de anticorpos antiamarílicos como possível fator de proteção para desfechos adversos da gestação.

3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO

NÍVEIS DE ANTICORPOS ANTIAMARÍLICOS E DESFECHO DA GESTAÇÃO EM MULHERES COM INFECÇÃO PELO ZIKA VIRUS. ESTUDO DA COORTE DE GESTANTES EM MANAUS, BRASIL

Isa Cristina Ribeiro Piauilino^{1,2}, Márcia da Costa Castilho⁴, Maurício Teixeira Lima⁷, Raillon Keven dos Santos Souza³, Yanka Karolinn Batista Rodrigues^{1,2}, Ayrton Sena Gouveia⁵, Maria das Graças Costa Alecrim¹, Camila Helena Aguiar Bôtto de Menezes¹, Flor Ernestina Martinez Espinosa^{4, 5*}

1 Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical (PPGMT/UEA), Manaus, Amazonas, Brazil.

2 Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Amazonas, Brazil.

3 Programa de Iniciação Científica da FMT-HVD (PAIC/FMT-HVD), Manaus, AM, Brasil.

4 Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Viera Dourado (FMT-HVD), Manaus, Amazonas, Brazil.

5 Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD – Fiocruz Amazônia) Manaus, Amazonas, Brazil.

6 Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas.

7 Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Minas Gerais.

* Corresponding author:

E-mail: florespinosa@gmail.com

Resumo

A febre do Zika é uma doença febril infecciosa com sintomatologia similar à causada por outros arbovírus, mas pode ocasionar alterações congênicas ao ser transmitida pela mãe infectada ao feto. Na epidemia do Zika Vírus em 2016, os estudos sugeriam uma diferença na distribuição regional da Síndrome Congênita, levantando a hipótese que em áreas de transmissão de Febre Amarela onde a cobertura vacinal é elevada, como na região Amazônica, poderia ter uma proteção cruzada. Com o objetivo de descrever a relação entre anticorpos antiamarílicos e o desfecho da gestação, um estudo foi desenvolvido em gestantes com doença exantemática que apresentaram infecção aguda pelo vírus Zika confirmada por RT-PCR. Os anticorpos antiamarílicos foram aferidos por PRNT e foram considerados como desfechos graves da gestação quando houve perda fetal, natimortalidade ou microcefalia no recém-nascido; desfecho moderado, quando houve parto prematuro, baixo peso ao nascer e/ou atraso no crescimento intrauterino e sem desfecho indesejado, quando nenhum destes eventos foi identificado. Foram incluídas 56 gestantes sendo que nove delas (16,1%) tiveram um desfecho grave, 20 (35,7%) moderado e 27 (48,2%) não tiveram evidência de desfecho adverso ao parto. O desfecho grave foi mais frequente entre as gestantes que apresentaram a infecção no primeiro trimestre da gestação. Foram evidenciados anticorpos neutralizantes para febre amarela em nove (100%) das gestantes com desfecho grave, em 16 (80%) com desfecho moderado ($0,62 < 0,78 < 0,99$; 95%) e em 26 (96,3%) das que nenhum desfecho adverso foi evidenciado, mas nestas últimas, a titulação dos anticorpos foi mais elevada. Os nossos dados sugerem que a presença de anticorpos neutralizantes antiamarílicos não protegeu as gestantes de eventos adversos graves causados pelo Zika vírus, mas um título elevado destes pode ter influenciado na gravidade do desfecho.

Palavras Chaves: Doença exantemática na gravidez, ZikaVírus, anticorpos antiamarílicos, PRNT, eventos adversos da gravidez, Vacina para Febre Amarela.

Introdução

A Febre do Zika é uma doença exantemática infecciosa aguda com apresentação sintomática geralmente leve, que podem durar de dois a sete dias, com relatos similares a infecção de outros arbovírus. Incluindo exantema, febre baixa, cefaleia, conjuntivite sem secreção, prurido, poliartralgia e edema (1,2). Em gestantes, o vírus pode ser transmitido para o feto, ocasionando complicações

neurológicas, anomalias ou acarretando em óbito fetal, como a síndrome congênita do Zika ou abortos espontâneos (3,4). A primeira transmissão autóctone no Brasil ocorreu no início de 2015 na região nordeste do país, com características clínicas semelhantes à síndrome da dengue e em dezembro desse mesmo ano o Ministério da Saúde estimou 440.000 a 1.300.000 casos suspeitos de Zika (5–7). Foram relatados mais de 4000 casos suspeitos de microcefalia até fevereiro de 2016. De acordo com o boletim epidemiológico da Secretária de Vigilância em Saúde em relação ao ano de 2015 até 2020, houve 19.492 casos suspeitos e 3.563 confirmados de síndrome congênita de Zika. Entre 2015 e 2019 concentrou-se a maioria dos casos confirmados na região Nordeste (n=2.207; 61,9%), seguido da região Sudeste (n=735; 20,6%)(8). A Febre Amarela é uma doença endêmica na região amazônica e a vacinação é a principal ferramenta utilizada para prevenção e controle da propagação da doença, além de atuar diretamente no aumento da expectativa de vida e redução da mortalidade em mulheres gestantes, no qual o risco de morbidade é elevado (9,10). Há estudos que evidenciam a possibilidade de proteção cruzada, tanto em vacina quanto em patógeno, diminuindo os riscos de infecção e o agravamento de doenças (11,12). O presente estudo foi desenvolvido a fim de estabelecer uma possível relação protetora entre a presença de títulos de anticorpos antiamarílicos e proteção contra desfechos adversos da gestação em mulheres com infecção por Zika, em uma região com imunização maciça contra Febre Amarela. Com o objetivo de relacionar e descrever os níveis de anticorpos antiamarílicos com o desfecho da gestação em mulheres que apresentaram infecção aguda pelo vírus da Zika durante a gestação.

Materiais e Métodos

Amostras Clínicas

Foram analisadas 56 amostras de um banco de 160 amostras coletadas de gestantes com infecção aguda de Zika entre janeiro a dezembro de 2016. As participantes foram recrutadas na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), a partir da demanda espontânea no ambulatório da Fundação.

Classificação dos desfechos adversos

Para o presente estudo foram definidos como efeitos adversos graves os casos de aborto, natimorto e microcefalia, como efeitos moderados aqueles que apresentavam baixo peso ao nascer ou parto pré-termo e sem efeito adverso quando nenhum deles foi evidenciado.

Vírus Estoque

A linhagem celular Vero foi mantida em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, GIBCO) a 28 °C. Os meios de crescimento foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO), 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (GIBCO). Os estoques virais foram produzidos utilizando a cepa selvagem wtYFV#3 (Laboratório de Flavivirus, FIOCRUZ, Brasil) e propagados conforme descrito em protocolo. O sobrenadante foi colhido 5 dias pós-infecção (dpi) e os estoques virais foram titulados por ensaio de placa.

Titulação do Vírus

A dosagem do título viral foi realizada pela contagem de placas produzida em monocamadas de células Vero e expresso em unidades formadoras de placas/ mL (PFU/mL). Foram utilizadas placas de 6 poços com células inoculadas 24h antes do uso. A titulação foi efetuada a partir da diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-6} da amostra viral, seguindo a inoculação de 100µ L das diferentes diluições em placas de 6 poços contidas com as monocamadas celulares. A placa foi mantida em estufa a 37°C com 5% de CO₂, sendo homogeneizada a cada 10 minutos durante uma hora. Após o descarte do excesso de vírus foi adicionado 2 mL de carboximetilcelulose (CMC). E após sete dias a placa foi fixada com formaldeído a 10% e corada com cristal violeta. O título foi obtido de acordo com o cálculo presente no protocolo, expresso em PFU/mL.

Testes de neutralização de redução de placa (PRNT)

A linhagem de células Vero, foi mantida em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Os meios de crescimento, foram suplementados com soro fetal bovino (SFB) 10% (GIBCO) e 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (GIBCO). As amostras de soro, foram inativadas a 56°C por 60 min e submetidos ao ensaio para determinar os títulos de anticorpos de neutralização específicos, conforme o ensaio descrito em protocolo. O PRNT, foi executado em placas de cultura de 6 poços, com 400.000 células Vero por poço, o inoculo de vírus a 50 PFU foi submetido a várias diluições de soro (1:20-1:640). As placas, foram fixadas com formol 10% e depois corados com cristal violeta. Os títulos de PRNT, foram expressos de acordo com a maior diluição de soro que inibiu 80% das placas (PRNT80). As amostras com PRNT80 <20 foram considerados negativas.

Ética

O consentimento informado por escrito foi obtido de cada paciente para o estudo, com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), sob a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), CAAE 60168216.2.0000.0005), parecer sob número de aprovação 2.375.813 versão 3.

Análise Estatística

Todos os dados foram armazenados em planilha Excel (Microsoft, Redmond, WA, EUA) e analisados usando o Epi Info 7 (Centers of Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, EUA) para análise de frequências e software R Studio para obtenção de Risco Relativo.

Resultados

A distribuição das características das gestantes inclusas estão apresentadas na tabela 1 em relação a presença ou ausência de anticorpos antiamarílicos. As mulheres são adultas com média de 24 anos, casadas, com algum nível de escolaridade e primíparas.

Os resultados apresentados em relação aos desfechos apresentado pelas crianças foram: 16,1% (09/56) graves, 35,7% (20/56) moderado e 48,2% (27/56) que não apresentaram efeito adverso ao nascer. Foi evidenciado a presença de anticorpos neutralizantes para febre amarela em 100% (09/09), (RR 1; 95%) dos desfechos graves, 80% (16/20), (RR 0,78; 95% IC 0,62-0,99) moderado e (26/27) 96,3% (RR 0,96; 95% IC 0,89-1,03) sem efeito adverso ao nascer conforme mostra a tabela 2.

O desfecho grave apresentou uma frequência maior no primeiro trimestre (5/6) 83,3% e o sem efeito adverso ao nascer no terceiro trimestre (18/27) 66,7%, tabela 3. Para avaliação da titulação de anticorpos foi utilizado o PRNT 80 com titulações variando <20 (negativo) a >640 (positivo) conforme mostra as figuras 1 e 2 respectivamente, obtendo a maioria das amostras positivas para a presença de anticorpos antiamarílicos e quatro negativas, possivelmente não vacinadas, tabela 2.

Em relação a frequência dos desfechos e a titulação de anticorpos, a maior parte dos desfechos graves apresentou titulação de 40 e 80 (6/9) que corresponde a 66,7%, assim com o desfecho moderado (11/20) que equivale a 45%. O desfecho sem alteração apresentou títulos maiores entre 160 a >640 (14/27) que corresponde a 51,8%, conforme mostra a tabela 4.

Tabela 1- Características epidemiológicas maternas considerando a presença ou ausência de anticorpos antiamarílico.

Característica	Positivo(%)	Negativo(%)
Estado civil		
Solteira	19 (37,2)	4 (80)
Casada	24 (47,1)	1 (20)
Não coletado	8 (15,7)	-
Escolaridade		
Ensino Médio	19 (37,2)	2 (40)
Ensino Médio Incompleto	5 (9,8)	-
Ensino Superior	8 (15,6)	-
Ensino Superior Incompleto	4 (7,8)	-
Ensino Fundamental	1 (2,0)	1 (20)
Ensino Fundamental Incompleto	6 (11,8)	2 (40)
Ignorado	8 (15,8)	-
Paridade		
Nenhum Parto	16 (31,4)	3 (60)
Um Parto	6 (11,8)	1 (20)
Dois Partos	6 (11,8)	-
Três Partos	2 (3,9)	-
Quatro Partos	1 (1,9)	-
Ignorado	20 (39,2)	1 (20)

Tabela 2- Características maternas com presença ou ausência de anticorpos antiamarílicos em relação ao trimestre de gestação e desfechos encontrados.

Característica	Positivo (%)	Negativo (%)	RR^a (IC95%)
Trimestre gestacional			
1°	14 (100)	-	1
2°	10 (71,4)	4 (28,6)	0,27(0,10-0,71)
3°	26 (96,3)	1 (3,7)	0,33(0,13-0,83)
Total	50 ^b	05 ^b	-
Desfechos na gestação			

Desfecho grave	9 (100)	-	1
Desfecho moderado	16 (80)	4 (20)	0,78(0,62-0,99)
Desfecho sem alterações	26 (96,3)	1 (3,7)	0,96(0,89-1,03)
Total	51	05	-

^a Risco Relativo;

^b Uma amostra sem informação de trimestre gestacional

Tabela 3- Distribuição do desfecho da gestação em mulheres expostas ao vírus Zika, segundo o trimestre da infecção. Coorte de Manaus.

Trimestres	Frequência Desfecho Grave (%)	Frequência Desfecho Moderado (%)	Frequência Desfecho Sem Alteração (%)
1	5 (83,3)	3 (15,8)	3 (11,1)
2	-	8 (42,1)	6 (22,2)
3	1 (16,7)	8 (42,1)	18 (66,7)
Total	6	19 (100)	27 (100)

Tabela 4- Distribuição do desfecho da gestação em mulheres expostas ao vírus Zika, segundo a titulação do PRNT 80 em relação aos diferentes desfechos.

Titulação PRNT80	Frequência Desfecho Grave (%)	Frequência Desfecho Moderado (%)	Frequência Desfecho Sem alteração (%)
<20	-	4 (20)	1 (3,7)
20	1 (11,1)	1 (5)	3 (11,1)
40	3 (33,3)	7 (35)	6 (22,2)
80	3 (33,3)	4 (20)	3 (11,1)
160	1 (11,1)	-	4 (14,8)

320	-	2 (10)	6 (22,2)
640	1 (11,1)	-	1 (3,7)
>640	-	2 (10)	3 (11,1)
Total	9 (100)	20 (100)	27 (100)

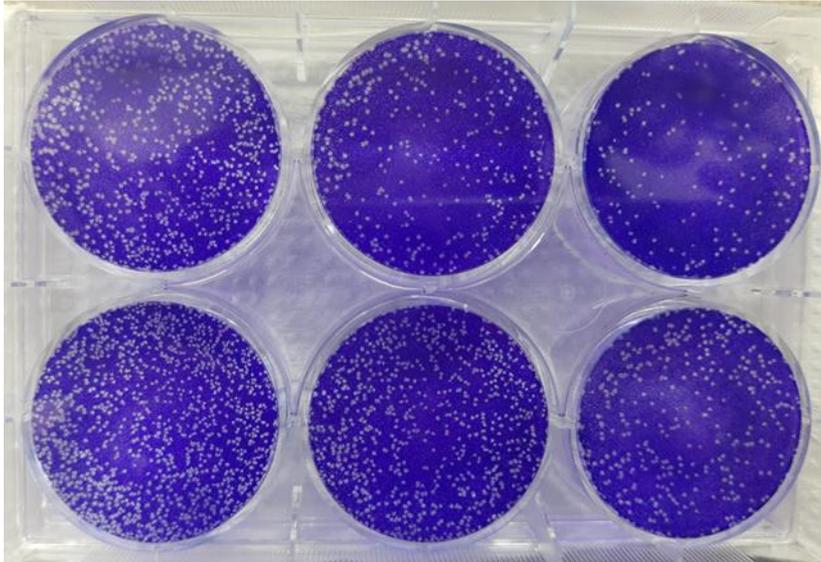


Figura 1- Imagem do teste de PRNT com controle negativo nas diluições de 1:20 a 1: 640. Nota-se uma maior quantidade de placas em cada poço indicando destruição celular.

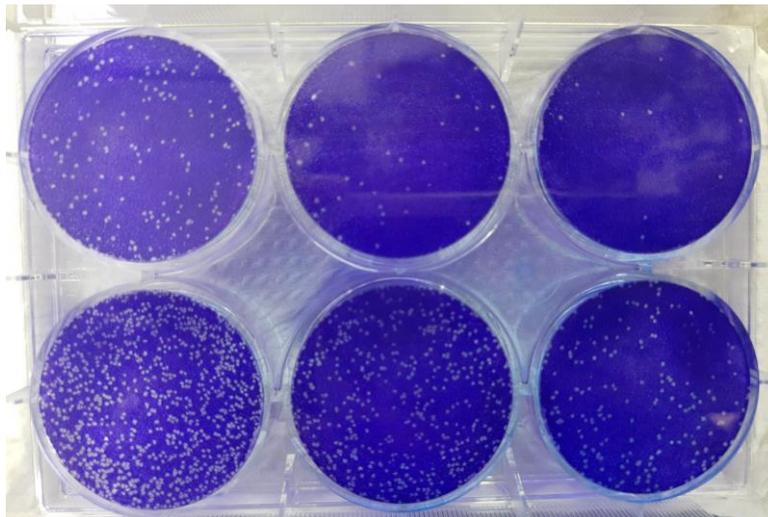


Figura 2- Imagem do teste de PRNT com amostra positiva para febre amarela realizada nas diluições de 1:20 a 1: 640. A região em roxo, indica o tapete celular não destruído e os pontos brancos representam a placa viral.

Discussão

Foi avaliada uma população de mulheres grávidas exantemática no período de epidemia do vírus Zika. Os eventos adversos foram observados e categorizados de acordo com a gravidade ou não dos casos apresentados. Os resultados adversos graves no feto, como aborto espontâneo, natimorto ou microcefalia foram mais frequentes em gestantes que tiveram a infecção no primeiro trimestre da gestação como já evidenciado em estudos anteriores (13,14). Há um estudo brasileiro com hipótese em relação a frequência de desfechos mais graves, como a microcefalia na região nordeste e com menores taxas na região norte do país, realizado através de agrupamentos de espaço-temporal populacional. Que infere a pequena proporção de desfecho grave da região norte, estar associada a cobertura vacinal de febre amarela existente na região, devido ser uma área endêmica para a febre amarela, além de possuir semelhança estrutural e clínica de ambos os vírus, haveria a possibilidade que os descendentes das gestantes tivessem menores riscos de apresentarem microcefalia e a síndrome congênita do Zika (15).

Porém, a maioria das amostras avaliadas no presente estudo mostraram positividade a presença de anticorpos neutralizantes em relação a doença, mas a maioria das gestantes foram infectadas no terceiro trimestre, o que traz baixas possibilidades de alterações no desenvolvimento e desfechos graves de acordo com os dados analisados.

Na região amazônica a vacinação geralmente é realizada a partir dos 9 meses de idade, e estudos recentes relatam que crianças submetidas a vacina antes dos dois anos de idade possuem probabilidade de apresentarem menores taxas de soroconversão após uma única dose (16), e crianças até 10 anos de idade podem apresentar um declínio substancial de proteção após avaliação de imunidade a longo prazo (17), o que poderia estar relacionado com as participantes que apresentaram negatividade nas amostras para a presença de anticorpos ou simplesmente não terem sido vacinadas. Em indivíduos adultos foi observada uma queda na taxa de soropositividade após dez anos de vacinação (16,18) o que provavelmente influencia na presença de anticorpos e na proteção do indivíduo.

Quanto a proteção cruzada de diferentes vacinas, existe a hipótese de que a vacina da febre amarela pode induzir uma proteção contra o ZIKV, vírus que são da mesma família e compartilham epítomos que podem ser evocados no mecanismo de proteção. Um estudo realizado em camundongos submetidos a uma dosagem da vacina YFV 17DD proporcionou proteção contra o ZIKV, diminuindo a carga viral no cérebro dos camundongos e prevenindo a perda de peso. Há efeito positivo em relação a proteção e o tempo de duração da vacina tem influência na imunidade, nas primeiras semanas, apresentaram proteção total aos efeitos adversos do vírus e a partir da quinta semana decaiu parcialmente. O estudo evidenciou uma eficaz proteção de camundongos adultos, porém, não de sucessores, sendo o único teste realizado em relação aos filhotes o de aleitamento, que mostrou-se negativo para proteção (11).

Outro estudo brasileiro realizado em indivíduos adultos primovacinados e revacinados com a vacina YFV 17DD em um período de seis meses, relataram pontos positivos em relação a neutralização cruzada contra o vírus da Zika, inferindo a possibilidade de proteção (12). A vacina contra a YFV evidencia aspectos positivos na proteção contra o Zika, mas na imunidade de indivíduos adultos age com mais eficiência no início, pois, sabe-se que com o passar dos anos há uma diminuição da soropositividade em adultos (18), principalmente em regiões endêmicas no qual a vacinação é realizada nos primeiros anos de vida.

Sabe-se que a imunização materna durante a gravidez pode induzir a transferência transplacentária de anticorpos para o recém-nascido a fim de reduzir a morbidade e mortalidade por doenças infecciosas após o nascimento (19). No entanto, não há dados que comprovem que a vacinação da febre amarela pode induzir uma proteção cruzada contra o Zika, prevenindo o desenvolvimento dos desfechos graves no feto. Isso porque, não há estudo de mulheres gestantes que foram vacinadas no início do período de gestação e acompanhadas até o parto para a avaliação dos resultados e avaliação da presença ou ausência de anticorpos encontrados nas amostras da mãe e da criança.

Estudos recentes realizados com a vacinação da COVID-19 evidenciaram que a vacinação na gravidez, induzem a produção de anticorpos neutralizantes em

mulheres grávidas e são transferidos aos recém-nascidos, tendo o tempo de administração da dose como fator importante para uma transferência adequada de anticorpos e proteção (19).

Conclusão

O presente estudo mostrou que a presença de anticorpos neutralizantes antiamarílico não influenciou na gravidade do desfecho. Possivelmente, devido a vacinação ocorrer nos primeiros anos de vida dessas mulheres e a presença de anticorpos diminuir com o passar dos anos. A maioria das amostras analisadas apresentaram desfecho sem efeito adverso no nascimento, provavelmente estaria ligado ao fato de a infecção ter ocorrido no terceiro trimestre da gestação. Nesse caso, como não há dados que comprovem a existência da proteção cruzada da vacina da febre amarela contra o vírus da Zika em gestantes, seria necessário um estudo de coorte a fim de acompanhar não só as gestantes vacinadas ou revacinadas, mas também avaliar os resultados encontrados na criança após o nascimento.

Referências bibliográficas

1. Kuno G, Chang GJJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol*. 2007;152(4):687–96.
2. Martínez De Salazar P, Suy A, Sánchez-Montalvá A, Rodó C, Salvador F, Molina I. Zika fever. *Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]*. 2016;34(4):247–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.016>
3. Faluyi U, Obadare O, Sangem A, Onuegbu CA, Medavarapu S. Complications Associated with Zika Virus Infection: A Systematic Review Study. *Technol Sci Am Sci Res J Eng [Internet]*. 2016;24(1):151–61. Available from: <http://asrjetsjournal.org/>
4. Mo Y, Alferez Salada BM, Tambyah PA. Zika virus - A review for clinicians. *Br Med Bull*. 2016;119(1):25–36.

5. Zanluca C, De Melo VCA, Mosimann ALP, Dos Santos GIV, dos Santos CND, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(4):569–72.
6. Hennessey M, Fischer M, Staples JE. Zika virus spreads to new areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(3):55–8.
7. Hennessey M, Fischer M, Staples JE. *Sci-Hub*. 2016;65(3):1–4.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika em 2020: até a SE 45. *Bol Epidemiológico* [Internet]. 2020;51(28):23–8. Available from: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/July/14/Boletim-epidemiologico-SVS-28-v2.pdf>
9. Monath TP, Vasconcelos PFC. Yellow fever. *J Clin Virol* [Internet]. 2015;64:160–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.030>
10. Swamy GK. Vaccinations for Pregnant Women. 2015;125(1):212–26.
11. Vicente Santos AC, Guedes-da-Silva FH, Dumard CH, Ferreira VNS, da Costa IPS, Machado RA, et al. Yellow fever vaccine protects mice against Zika virus infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15(11):e0009907.
12. Ribeiro B. Estudo dos eventos virológicos e imunológicos em humanos após a imunização com a vacina da febre amarela 17 DD: Análise da capacidade de proteção cruzada envolvendo infecções heterólogas. 2020;
13. Redivo E de F, Menezes CB, Castilho M da C, Brock M, Magno E da S, Saraiva MDGG, et al. Zika virus infection in a cohort of pregnant women with exanthematic disease in Manaus, Brazilian Amazon. *Viruses*. 2020;12(12):1–16.
14. Damasceno L, Terzian ACB, Fuller T, Estofolete CF, Andrade A, Kroon EG, et al. Why did zikv perinatal outcomes differ in distinct regions of brazil? An exploratory study of two cohorts. *Viruses*. 2021;13(5):1–12.
15. De Góes Cavalcanti LP, Tauil PL, Alencar CH, Oliveira W, Teixeira MM, Heukelbach J. Zika virus infection, associated microcephaly, and low yellow fever vaccination coverage in Brazil: Is there any causal link. *J Infect Dev Ctries*. 2016;10(6):563–6.
16. Staples JE, Barrett ADT, Wilder-Smith A, Hombach J. Review of data and knowledge gaps regarding yellow fever vaccine-induced immunity and duration of

protection. *npj Vaccines* [Internet]. 2020;5(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41541-020-0205-6>

17. de Noronha TG, de Lourdes de Sousa Maia M, Geraldo Leite Ribeiro J, Campos Lemos JA, Maria Barbosa de Lima S, Martins-Filho OA, et al. Duration of post-vaccination humoral immunity against yellow fever in children. *Vaccine*. 2019;37(48):7147–54.

18. Roukens AHE, Van Halem K, De Visser AW, Visser LG. Long-term protection after fractional-dose yellow fever vaccination follow-up study of a randomized, controlled, noninferiority trial. *Ann Intern Med*. 2018;169(11):761–5.

19. Cassaniti I, Percivalle E, Zelini P, Ngaradoumbe Nanhorngue K, Parolo A, Bernardi V, et al. Both SARS-CoV-2 infection and vaccination in pregnancy elicited neutralizing antibodies in pregnant women and newborns. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2021;27(11):1708–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.08.004>

4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS FUTURAS

As limitações do estudo estão relacionadas ao número de amostras avaliadas, que foi inferior ao total de amostras previstas para análise. Devido ao tempo e complexidade para a padronização da técnica de PRNT não foi possível o processamento de todas. Além da priorização dos desfechos no momento da seleção das amostras que não foi bem sucedida, pois as amostras foram separadas de maneira equivalente, sendo que 90% das amostras são de categoria sem efeito adverso.

Espera-se que sejam finalizadas as análises de todas as amostras previstas no banco, a fim de obter resultados mais robustos.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a presença de anticorpos neutralizantes antiamarílico não influenciou na gravidade do desfecho. Possivelmente, devido a vacinação ocorrer nos primeiros anos de vida dessas mulheres e a presença de anticorpos diminuir com o passar dos anos. A maioria das amostras analisadas apresentaram desfecho sem efeito adverso no nascimento, provavelmente estaria ligado ao fato de a infecção ter ocorrido no terceiro trimestre da gestação. Nesse caso, como não há dados que comprovem a existência da proteção cruzada da vacina da febre amarela contra o vírus da Zika em gestantes, seria necessário um estudo de coorte a fim de acompanhar não só as gestantes vacinadas ou revacinadas, mas também avaliar os resultados encontrados na criança após o nascimento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kuno G, Chang GJJ. Full-length sequencing and genomic characterization of

- Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol*. 2007;152(4):687–96.
2. Martínez De Salazar P, Suy A, Sánchez-Montalvá A, Rodó C, Salvador F, Molina I. Zika fever. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2016;34(4):247–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.016>
 3. Faluyi U, Obadare O, Sangem A, Onuegbu CA, Medavarapu S. Complications Associated with Zika Virus Infection: A Systematic Review Study. *Technol Sci Am Sci Res J Eng* [Internet]. 2016;24(1):151–61. Available from: <http://asrjetsjournal.org/>
 4. Mo Y, Alferez Salada BM, Tambyah PA. Zika virus - A review for clinicians. *Br Med Bull*. 2016;119(1):25–36.
 5. Dick G. Zika isolation and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1952;46(5):509–20.
 6. Basu R, Tumban E. Zika Virus on a Spreading Spree: what we now know that was unknown in the 1950's. *Virol J* [Internet]. 2016;13(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-016-0623-2>
 7. Baronti C, Piorkowski G, Charrel RN, Boubis L, Leparç-Goffart I, de Lamballerie X. Complete coding sequence of Zika virus from a French Polynesia outbreak in 2013. *Genome Announc*. 2014;2(3):2013–4.
 8. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, et al. Genetic characterization of zika virus strains: Geographic expansion of the asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(2).
 9. Shi Y, Gao GF. Structural Biology of the Zika Virus. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2017;42(6):443–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2017.02.009>
 10. Javed F, Manzoor KN, Ali M, Haq IU, Khan AA, Zaib A, et al. Zika virus: what we need to know? *J Basic Microbiol*. 2018;58(1):3–16.
 11. Gatherer D, Kohl A. Zika virus: A previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. *J Gen Virol*. 2016;97(2):269–73.
 12. Rodrigues C. Triagem de genótipos de arbovírus de importância clínico-epidemiológica no Brasil: Dengue 4, Chikungunya e Zika. 2015;
 13. Savage HM, Fritz CL, Rutstein D, Yolwa A, Vorndam V, Gubler DJ. Epidemic of dengue-4 virus in Yap State, Federated States of Micronesia, and implication of *Aedes hensilli* as an epidemic vector. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;58(4):519–24.
 14. Durand MA, Bel M, Ruwey I, Marfel M, Yug L, Ngaden V. An outbreak of

dengue fever in Yap State. *Pacific Health Dialog: a Public Pacific Basin Off Train Program Fiji Sch Med.* 2005;12(2):99–102.

15. Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 2009;360(24):2536–43.

16. Cao-Lormeau VM, Roche C, Aubry M, Teissier A, Lastere S, Daudens E, et al. Recent emergence of dengue virus serotype 4 in French Polynesia results from multiple introductions from other South Pacific Islands. *PLoS One.* 2011;6(12).

17. Aubry M, Finke J, Teissier A, Roche C, Brout J, Paulous S, et al. Silent circulation of Ross River virus in French Polynesia. *Int J Infect Dis.* 2015;37(February 1984):e19–24.

18. Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect [Internet].* 2014;20(10):O595–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12707>

19. Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daures M, John M, Grangeon J-P, et al. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. (LETTERS)(Report)(Letter to the editor). *Emerg Infect Dis.* 2015;21(2):381.

20. Roth A, Mercier A, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E, et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections – An unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Eurosurveillance.* 2014;19(41):1–8.

21. Tognarelli J, Ulloa S, Villagra E, Lagos J, Aguayo C, Fasce R, et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Arch Virol.* 2016;161(3):665–8.

22. Zanluca C, De Melo VCA, Mosimann ALP, Dos Santos GIV, dos Santos CND, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(4):569–72.

23. Hennessey M, Fischer M, Staples JE. Zika virus spreads to new areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65(3):55–8.

24. Hennessey M, Fischer M, Staples JE. *Sci-Hub.* 2016;65(3):1–4.

25. Victora CG, Schuler-Faccini L, Matijasevich A, Ribeiro E, Pessoa A, Barros FC. Microcephaly in Brazil: How to interpret reported numbers? *Lancet.*

2016;387(10019):621–4.

26. Cauchemez S, Besnard M, Bompard P, Dub T, Guillemette-Artur P, Eyrolle-Guignot D, et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: A retrospective study. *Lancet* [Internet]. 2016;387(10033):2125–32. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00651-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00651-6)
27. Jouannic JM, Friszer S, Leparc-Goffart I, Garel C, Eyrolle-Guignot D. Zika virus infection in French Polynesia. *Lancet*. 2016;387(10023):1051–2.
28. De Lima Campos T, Durães-Carvalho R, Rezende AM, De Carvalho OV, Kohl A, Wallau GL, et al. Revisiting key entry routes of human epidemic arboviruses into the mainland americas through large-scale phylogenomics. *Int J Genomics*. 2018;2018.
29. Crescimento DO, Relacionadas ED. Atenção à criança.
30. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(6):653–60.
31. Constant B. *Boletim Epidemiológico Arboviroses*. 2020;
32. Questions FA, Information ATO, Website T. Novo boletim aponta 2,3 mil casos de zika confirmados em Manaus. 2020;1–2.
33. Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res*. 2002;33(4):330–42.
34. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus Fact Sheet. WPRO Fact Sheets [Internet]. 2016;29(3):1-. Available from: <https://cmr.asm.org/content/cmr/29/3/487.full.pdf>
35. Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika Virus. *N Engl J Med*. 2016;374(16):1552–63.
36. HADDOW AJ, WILLIAMS MC, WOODALL JP, SIMPSON DI, GOMA LK. Twelve Isolations of Zika Virus From *Aedes (Stegomyia) Africanus* (Theobald) Taken in and Above a Uganda Forest. *Bull World Health Organ*. 1964;31(1961):57–69.
37. Diagne CT, Diallo D, Faye O, Ba Y, Faye O, Gaye A, et al. Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2015;15(1):2–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-015-1231-2>
38. Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Mboui Ondo S, Jiolle D, et al. Zika Virus in Gabon (Central Africa) - 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(2).

39. Wong PSJ, Li M zhi I, Chong CS, Ng LC, Tan CH. *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse): A Potential Vector of Zika Virus in Singapore. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(8):1–6.
40. Ledermann JP, Guillaumot L, Yug L, Saweyog SC, Tided M, Machieng P, et al. *Aedes hensilli* as a Potential Vector of Chikungunya and Zika Viruses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(10).
41. Bôtto-Menezes CHA, Neto AM, Calvet GA, Kara EO, Lacerda MVG, da Costa Castilho M, et al. Zika virus in rectal swab samples. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(5):951–4.
42. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Potential sexual transmission of zika virus. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(2):359–61.
43. Murray KO, Gorchakov R, Carlson AR, Berry R, Lai L, Natrajan M, et al. Prolonged detection of zika virus in vaginal secretions and whole blood. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(1):99–101.
44. Colt S, Garcia-Casal MN, Peña-Rosas JP, Finkelstein JL, Rayco-Solon P, Weise Prinzo ZC, et al. Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily-fluids: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(4).
45. Plourde AR, Bloch EM. 15-1990. 2016;22(7):1185–92.
46. De Carvalho NS, De Carvalho BF, Fugaça CA, Dóris B, Biscaia ES. Zika virus infection during pregnancy and microcephaly occurrence: A review of literature and Brazilian data. *Brazilian J Infect Dis*. 2016;20(3):282–9.
47. Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, Pessoa A, Ventura C V., Da Fonseca EB, et al. Characterizing the pattern of anomalies in congenital zika syndrome for pediatric clinicians. *JAMA Pediatr*. 2017;171(3):288–95.
48. Leal MC, Muniz LF, Ferreira TSA, Santos CM, Almeida LC, Van Der Linden V, et al. Hearing loss in infants with microcephaly and evidence of congenital zika virus infection — Brazil, November 2015–May 2016. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(34):917–9.
49. Fontes CAP, dos Santos AASMD, Marchiori E. Magnetic resonance imaging findings in Guillain-Barré syndrome caused by Zika virus infection. *Neuroradiology* [Internet]. 2016;58(8):837–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00234-016-1687-9>

50. Boldescu V, Behnam MAM, Vasilakis N, Klein CD. Broad-spectrum agents for flaviviral infections: Dengue, Zika and beyond. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2017;16(8):565–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2017.33>
51. França GVA de, Pedi VD, Garcia MH de O, Carmo GMI do, Leal MB, Garcia LP. Síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika em nascidos vivos no Brasil: descrição da distribuição dos casos notificados e confirmados em 2015-2016. *Epidemiol e Serv saude Rev do Sist Unico Saude do Bras*. 2018;27(2):e2017473.
52. Robinson N, Mayorquin Galvan EE, Zavala Trujillo IG, Zavala-Cerna MG. Congenital Zika syndrome: Pitfalls in the placental barrier. *Rev Med Virol*. 2018;28(5):1–7.
53. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika virus associated with microcephaly. *N Engl J Med*. 2016;374(10):951–8.
54. Costello A, Dua T, Duran P, Gülmezoglu M, Oladapo OT, Perea W, et al. Defining the syndrome associated with congenital Zika virus infection. *Bull World Health Organ*. 2016;94(6):406-406A.
55. Abumourad IM. Goncalves, 2014. 2014;
56. Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-spaeth G, Duangchinda T, et al. Ni.3515. *Nat Immunol* [Internet]. 2016;(June):1–8. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.3515>
57. Product TV, Project PVP, Foundation MG. Guideline for PRNT. 2014;(September 2011):1–3.
58. Araujo Alves Peixoto Filho A, Baltar de Freitas S, Morikoshi Ciosaki M, Nogueira Oliveira L, Tavares dos Santos Júnior O. Aspectos de imagem de tomografia computadorizada e ressonância magnética em crianças com microcefalia possivelmente relacionada a infecção congênita pelo vírus Zika Computed tomography and magnetic resonance imaging findings in infants with microcephaly p. *Radiol Bras* [Internet]. 2018;51(2):2016–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-3984.2016.0135>
59. Fanco O. História da Febre Amarela no Brasil. *História da Febre Amarela no Bras*. 1969;
60. Paolo PM, Gould EA, Gao GF, Harvey PH, Holmes EC. Population dynamics

of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(2):548–53.

61. Monath TP. Yellow fever: An update. *Lancet Infect Dis*. 2001;1(1):11–20.

62. Editora DJ. Febre Amarela: A doença e a vacina, uma história inacabada . Jaime Larry Benchimol . A . H . Goodman , D . L . Dufour & G . H . Pelto (ed .). Mountain View. 2002;18(5):1480–7.

63. Vasconcelos PF da C. Febre Amarela. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2003;36(2):275–93. Available from: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=290004&indexSearch=ID>

64. Douam F, Ploss A. Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. *Trends Microbiol* [Internet]. 2018;26(11):913–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.012>

65. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da {Saúde} ({BR}). {Secretaria} de {Vigilância} em {Saúde}. {Vigilância} em saúde no {Brasil} 2003{\textbar}2019: da criação da {Secretaria} de {Vigilância} em {Saúde} aos dias atuais. 2019;(50 (n.esp)). Available from: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/25/boletim-especial-21ago19-web.pdf>

66. Monath TP, Vasconcelos PFC. Yellow fever. *J Clin Virol* [Internet]. 2015;64:160–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.030>

67. Bonaldo MC, Garratt RC, Freire MS, Galler R. Expression of foreign protein epitopes at the surface of recombinant yellow fever 17D viruses based on three-dimensional modeling of its envelope protein. *Cell Biochem Biophys*. 2006;44(3):313–24.

68. Lindenbach B, Thiel H, Rice C. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. *Emerg Neurol Infect*. 2005;239–60.

69. World Health Organization. Febre Amarela | Organização Mundial da Saúde. 2019;1–7. Available from: https://www.medicinanet.com.br/conteudos/conteudo/1756/febre_amarela.htm

70. Brasil.Ministério da Saúde.Secretária de Atenção à Saúde. Febre Amarela: Guia de profissionais de Saúde,-1, ed, atual-Brasília:Ministério da Saúde 2018. Febre amarela. Brasil.Ministério da Saúde.Secretária de Atenção à Saúde. Febre Amarela:

Guia de profissionais de Saúde,-1, ed atual-B da S, editor. 2018.

71. Ellis1 BRADTB. The enigma of yellow fever in East Africa. *Rev Med Virol.* 2009;19(1):57–64.
72. Lopes RL, Pinto JR, Junior GB da S, Santos AKT, Souza MTO, Daher EDF. Kidney involvement in yellow fever: A review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2019;61(March):1–11.
73. Swamy GK. Vaccinations for Pregnant Women. 2015;125(1):212–26.
74. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis M da S do B. Manual de Normas e Procedimentos para Vacinação [Internet]. Ministério da Saúde do Brasil. 2014. 176 p. Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_procedimentos_vacinacao.pdf
75. Vigilância S De. *Epidemiológico.* 2015;46:1–10.
76. Jr MG. Vacinação contra influenza e febre amarela terá mudanças em 2020. 2020;1–3. Available from: <https://pebmed.com.br/vacinacao-contra-influenza-e-febre-amarela-tera-mudancas-em-2020/>
77. Ezalia E, R IE, Elizabeth G, My WANH, Norhanim A, Wahidah A, et al. Preexisting and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans. *Orphanet J Rare Dis.* 2020;21(1):1–9.
78. Lobigs M, Diamond MS. the Japanese encephalitis serocomplex. *Expert Rev Vaccines.* 2012;11(2):177–87.
79. Vicente Santos AC, Guedes-da-Silva FH, Dumard CH, Ferreira VNS, da Costa IPS, Machado RA, et al. Yellow fever vaccine protects mice against Zika virus infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021;15(11):e0009907.
80. Guirakhoo F, Kitckener S, Morrison D, Forrat R, McCarthy K, Nichols R, et al. Live attenuated chimeric yellow fever dengue type 2 (ChimeriVaxTM- DEN2) vaccine: Phase I clinical trial for safety and immunogenicity - Effect of yellow fever pre-immunity in induction of cross neutralizing antibody responses to all 4 dengue serotypes. *Hum Vaccin.* 2006;2(2):60–7.
81. Covián C, Fernández-Fierro A, Retamal-Díaz A, Díaz FE, Vasquez AE, Lay MK, et al. BCG-Induced Cross-Protection and Development of Trained Immunity: Implication for Vaccine Design. *Front Immunol.* 2019;10(November):1–14.
82. Rodriguez-Barraquer I, Costa F, Nascimento EJM, Júnior NN, Castanha PMS, Sacramento GA, et al. Impact of preexisting dengue immunity on Zika virus

emergence in a dengue endemic region. *Science* (80-). 2019;363(6427):607–10.

83. Carvalho MS, Freitas LP, Cruz OG, Brasil P, Bastos LS. Association of past dengue fever epidemics with the risk of Zika microcephaly at the population level in Brazil. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–9.

84. Pedroso C, Fischer C, Feldmann M, Sarno M, Luz E, Moreira-Soto A, et al. Cross-protection of dengue virus infection against congenital Zika syndrome, northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(8):1485–93.

85. Zavattoni M, Rovida F, Percivalle E, Cassaniti I, Sarasini A, Arossa A, et al. Zika virus infection in pregnancy: Advanced diagnostic approaches in dengue-naive and dengue-experienced pregnant women and possible implication for cross-reactivity and cross-protection. *Microorganisms*. 2020;8(1).

86. De Góes Cavalcanti LP, Tauil PL, Alencar CH, Oliveira W, Teixeira MM, Heukelbach J. Zika virus infection, associated microcephaly, and low yellow fever vaccination coverage in Brazil: Is there any causal link. *J Infect Dev Ctries*. 2016;10(6):563–6.

6. APÊNDICES

6.1 Manipulação de Células de Cultura

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

GERÊNCIA DE VIROLOGIA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO

Título:	Manipulação de células de cultura
Adaptado por:	Isa Piauilino

I. Objetivo:

Elucidar o procedimento operacional padrão para a manipulação de células de cultura.

II. Campo de Aplicação:

Sala de Cultura

III. Definições:

SFB	Soro Fetal Bovino
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
PBS	Tampão Fosfato-Salina (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PFU	Unidades Formadas de Placas (do inglês <i>Plaque-Forming Unit</i>)
°C	Graus Celsius
CO ₂	Dióxido de Carbono
mL	Mililitro
µL	Microlitro

IV. Responsabilidades:

Equipe do laboratório de Cultura: Realizar todo o procedimento prévio de assepsia do fluxo laminar antes de iniciar o procedimento e utilizar todos os EPIs (jaleco descartável, luvas, máscaras e touca). Identificar os criotubos antes do início da manipulação.

V. Procedimentos:

Congelamento de Vero

- 1- Lavar as células com PBS 1 X por duas vezes (retirar bem todo o excesso de PBS);
- 2- Tripsinizar as células de 2-3 min em estufa a 37°C. Se for feito em garrafa pequena utilizar 0,5 mL, garrafa média 1 mL e garrafa grande 1,5 mL da solução;
- 3- Após o tempo as células podem ser soltas com tapas na lateral da garrafa, até a mudança de turbidez da solução de tripsina;
- 4- Acrescentar meio enriquecido com SFB a 20% para neutralização da tripsina;
- 5- Para o congelamento, deve-se calcular o volume final a ser congelado e acrescentar 10% de DMSO e 20% de SFB ao volume de células (se necessário completar com meio de cultura até o valor do volume final desejado);
- 6- Fazer alíquotas de 1 mL em criotubos previamente identificados com os dados do congelamento: Nome da célula, data, passagem;
- 7- Congelar por 24 horas no -70°C e posteriormente transferir para o N₂.

Exemplo:

Volume final: 45 mL		Volume final: 5 mL	
DMSO 10%-	4,5 mL	DMSO 10%-	500 mL
SFB 20%-	9,0 mL	SFB 20%-	1,0 mL
Células-	18 mL	Células-	2,0 mL
Meio de cultura-	13,5 mL	Meio de cultura-	1,5 mL

Descongelamento de Células Vero

Materiais:

Descarte

Microtubos de 1,5 mL (02 unidades)

Pipetas

Ponteiras de 1000 μ L

Pipeta sorológica de 5 mL

Garrafa de cultura pequena

Suporte para microtubo

Meio DMEM suplementado com penicilina e anfotericina

SFB

Procedimentos:

- 1- Colocar o criotubo com as células congeladas imediatamente em banho maria a 37°C até o seu descongelamento total, por volta de 2 minutos;
- 2- Imediatamente após descongelamento, dentro da cabine de fluxo laminar, transferir o conteúdo do criotubo para um tubo (aproximadamente 1 mL) para um tubo falcon de 15 mL contendo 9 mL de DMEM 20% de SFB;
- 3- Levantar os tubos falcon com as células para a centrífuga por 7 minutos a 125 x g;
- 4- Preparar uma garrafa pequena contendo 5 mL de meio DMEM, suplementado com antibióticos e SFB 20%;
- 5- Descartar o sobrenadante presente no tubo falcon de 15 mL;
- 6- Retirar 2 mL do meio do item nº4 e ressuspender as células suavemente;
- 7- Transferir as células ressuspensas para a garrafa com o meio DMEM;
- 8- Levantar a estufa a 37°C.

6.2 Infecção de células Vero

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

GERÊNCIA DE VIROLOGIA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO

Título:	Infecção das células Vero
Adaptado por:	Isa Piauilino

VI. Objetivo:

Elucidar o procedimento operacional padrão para Infecção de células Vero.

VII. Campo de Aplicação:

Sala de Cultura

VIII. Definições:

SFB	Soro Fetal Bovino
DMEM	Do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
PBS	Tampão Fosfato-Salina (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PFU	Unidades Formadas de Placas (do inglês <i>Plaque-Forming Unit</i>)
°C	Graus Celsius
CO ₂	Dióxido de Carbono
mL	Mililitro
µL	Microlitro

IX. Responsabilidades:

Equipe do laboratório de Cultura: Realizar todo o procedimento prévio de assepsia do fluxo laminar antes de iniciar o procedimento e utilizar todos os EPIs (jaleco descartável, luvas, máscaras e touca).

Materiais:

Descarte

Pipeta

Ponteira de 1000 μ L

Pipeta sorológica de 5 mL

Suporte para tubo e microtubos

Meio DMEM suplementado com penicilina e anfotericina B

SFB

Alíquota com Vírus

Caixa de isopor com gelo

Procedimentos:

- 1- Descartar o meio de cultura da garrafa que será utilizada para a confecção da placa;
- 2- Lavar com PBS 1X por duas vezes e retirar o excesso;
- 3- Utilizar 1 mL (garrafa média) de tripsina, deixar agir por três minutos em estufa a 37°C em seguida bater para soltura das células;
- 4- Adicionar 10 mL de meio DMEM suplementado com SFB a 10%;
- 5- Resuspender suavemente por no mínimo 10 vezes e passar para um falcon de 50 mL;
- 6- Homogêinize e transfira 10 μ L para câmara de newbauer para realizar a contagem, verificar se todo o espaço da câmara foi ocupado e sem presença de bolhas;
- 7- Conte os 4 quadrantes, tire a média e multiplique por 10^4 (números de células em 1 mL);
- 8- Conte o número total de poços que será utilizado e some mais três poços como margem de erro. Multiplique o total de poços por 400.000, número ideal de

células por poço para aproximadamente 70% de confluência que a placa de seis poços apresentará no dia seguinte;

- 9- Faça o cálculo em regra de três para encontrar o volume correspondente a quantidade de células que deve ser retirada da suspensão suficiente para o número de poços desejados;
- 10- Em paralelo, calcule o volume final de DMEM 10% de SFB necessário para a confecção de todos os poços. Inicialmente, o número total de poços e mais três poços de margem de erro, deve ser multiplicado por 2 mL (volume de meio que é adicionado em cada poço). Após a multiplicação deve ser subtraído o volume da suspensão de células calculada no item 9 para se obter valor final de meio;
- 11- Em um falcon de 50 mL, coloque a quantidade da suspensão de células calculada e complete para o volume final com meio DMEM com SFB a 10%;
- 12- Distribua 2 mL em cada poço, espalhe bem para as células com movimentos circulares em forma de cruz para que os poços fiquem homogêneos;
- 13- Leve a estufa a 37°C por 24 horas;
- 14- No dia seguinte será calculada a quantidade de células presentes nos poços, tendo como base a quantidade de célula utilizada no dia anterior;
- 15- Por exemplo no primeiro dia em cada poço é estimado 400.000 células por poço, no dia posterior essa quantidade de células vai para 800.000 em cada poço;
- 16- Baseado no segundo dia é realizado o cálculo em MOI (Multiplicity of Infection) de 0,01 que representa a proporção de vírus utilizado para o alvo da infecção (células), ou seja 100 menos vírus para cada célula;
- 17- E de acordo com uma alíquota anterior já titulada é realizado uma regra de três para encontrar a quantidade de vírus para a proporção de células que será infectada;
- 18- Exemplo: Para infectar um poço com 800.000 células que correspondem a $8 \cdot 10^5$ é utilizada uma MOI de 0,01 que ficará $8 \cdot 10^3$. Se o valor de uma alíquota já titulada for $7,9 \cdot 10^5$ o cálculo seguirá desta forma para um único poço:

$$7,9 \cdot 10^5 \text{ ————— } 1000 \text{ uL}$$

$$8 \cdot 10^3 \text{ ————— } X$$

$$X = \frac{8 \cdot 10^6}{7,9 \cdot 10^5} \Rightarrow X = 1,01 \cdot 10^1 \Rightarrow X = 10 \text{ uL de vírus}$$

Em um poço será utilizada 400 uL de meio para a adsorção do vírus:

$$\begin{array}{r} 400 \text{ uL} \times 1 \text{ poço} - 400 \text{ uL total da solução} \\ - 10 \text{ uL de vírus} \\ \hline 390 \text{ uL de meio} \end{array}$$

É realizado essa mistura, em seguida vortexado e colocado no poço, que será levado a estufa e homogeneizado por 1 hora em 10-10 min. Depois da adsorção, descartar e colocar 2 mL de meio suplementado a 2%, levar a estufa e de acordo com os dias ver a ação do vírus sobre as células. Quando estiver com efeito generalizado pode ser feita a coleta do vírus multiplicado.

6.3 Titulação Viral em Placa de 6 Poços

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

GERÊNCIA DE VIROLOGIA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO

Título:	Protocolo de Titulação Viral em Placa de 6 Poços
Adaptado por:	Isa Piauilino

I. Objetivo:

Elucidar o procedimento operacional padrão para a titulação viral.

II. Campo de Aplicação:

Laboratório de Cultura

III. Definições:

SFB	Soro Fetal Bovino
DMEM	Do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
PBS	Tampão Fosfato-Salina (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PFU	Unidades Formadas de Placas (do inglês <i>Plaque-Forming Unit</i>)
°C	Graus Celsius
CO ₂	Dióxido de Carbono
mL	Mililitro
µL	Microlitro

IV. Responsabilidades:

Equipe do laboratório de Cultura: Realizar todo o procedimento prévio de assepsia do fluxo laminar antes de iniciar o procedimento e utilizar todos os EPIs (jaleco descartável, luvas, máscaras e touca).

V. Procedimentos:

Dia anterior da titulação

Confecção da placa de 6 poços:

Lave com PBS 1X autoclavado por 2X uma garrafa média ou grande de células;

Retire bem o excesso de PBS com uma pipeta sorológica;

Coloque 1 mL de tripsina, deixe cobrir toda a monocamada;

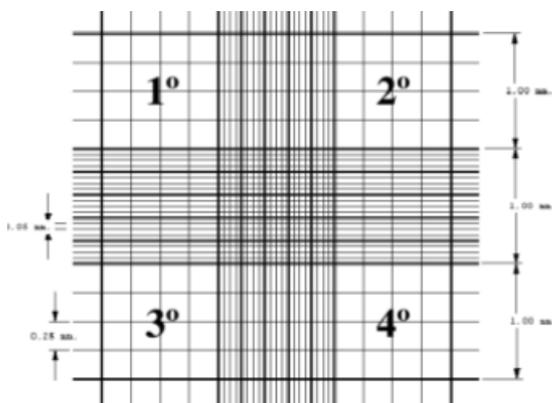
Leve a estufa 37°C e deixe a tripsina agir por 3 min, em seguida bata a garrafa até que as células se soltem;

Coloque 10 mL de meio suplementado com SFB a 10% na garrafa para neutralizar o efeito da tripsina e ressuspender as células suavemente por 10 vezes com a pipeta sorológica;

Após a ressuspensão, passe para um falcon de 50 mL;

Homogeneize e transfira 10 μ L na câmara de newbauer para contagem;

Conte os 4 quadrantes, tire a média e multiplique por 10^4 (números de células em 1 mL);



Calcule na proporção de 400.000 células por poço para utilizar em placas de 6 poços;

Conte o número total de poços que será utilizado e some mais três poços para serem a margem de erro. Multiplique o total de poços por 400.000 células, número ideal de células por poço para aproximadamente 70% de confluência que apresentará na placa de seis poços no dia seguinte;

Faça o cálculo em regra de três para encontrar o volume correspondente a quantidade de células que deve ser retirada da suspensão suficiente para o número de poços desejados;

Em paralelo, calcule o volume final de DMEM 10% de SFB necessário para a confecção de todos os poços. Inicialmente, o número total de poços, mais três de margem de erro, deve ser multiplicado por 2 mL (volume de meio que é adicionado em cada poço). Após a multiplicação será subtraído o volume da suspensão de células calculadas para se obter o valor final de meio;

Em um falcon de 50 mL, coloque a quantidade de suspensão de células calculada e complete para o volume final com meio DMEM com SFB a 10%;

Distribua 2 mL em cada poço, espalhe bem para as células com movimentos em forma de cruz para que os poços fiquem homogêneos;

Leve a estufa a 37°C por 24 horas;

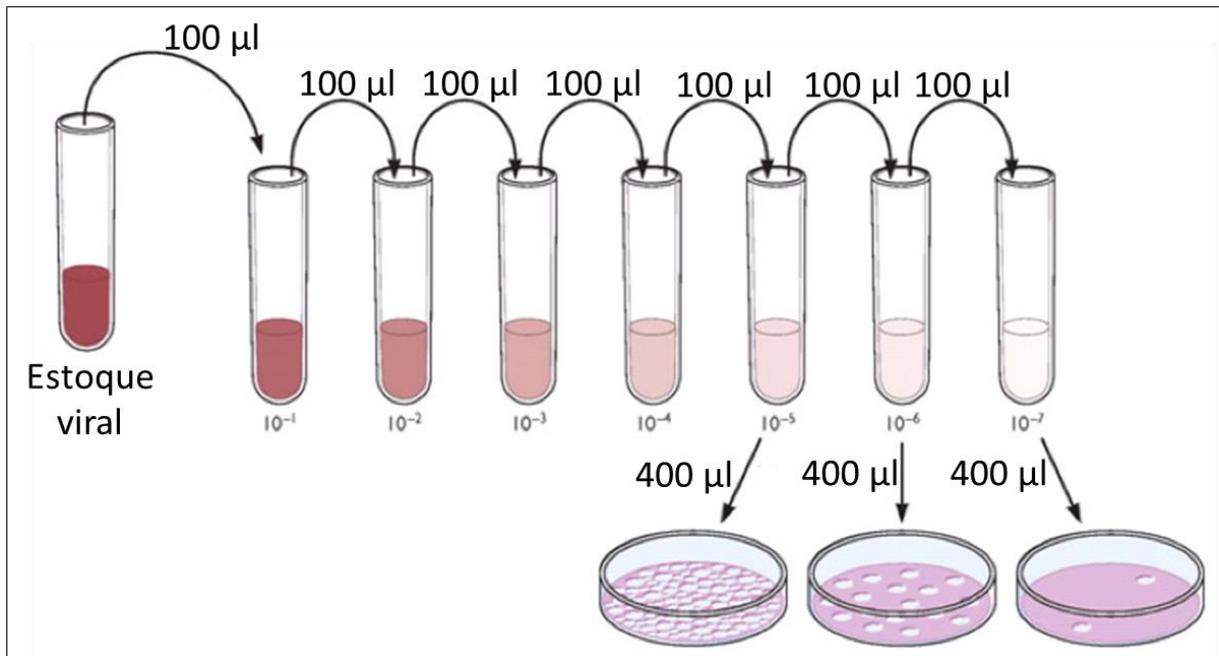
Diluição em base 10 e Infecção da Placa

Organizar 6 a 7 microtubos autoclavados de 1,5 mL na rack e enumerar de -1 a -6;

Colocar 900 μ L de meio de manutenção em cada microtubo;

Colocar 100 μ L de fluido viral (referente às alíquotas do vírus alvo) no primeiro microtubo e homogeneizar em vórtex;

Retirar 100 μ L do primeiro microtubo e colocar no segundo e homogeneizar em vórtex novamente. Diluir sucessivamente da mesma forma até o último microtubo;



Infecção:

Identificar as placas com as diluições referentes;

Remover completamente o meio de cultura da placa;

Lavar com PBS e remover o excesso com a placa inclinada;

Colocar 400 μ L de cada uma das diluições em cada poço (no controle colocar 400 μ L de meio sem vírus);

Adsorver o vírus por uma hora em estufa na presença de $\text{CO}_2/37^\circ\text{C}$;

Mover a placa de 10 em 10 minutos durante a adsorção, movimentando todas as placas em diversas direções, fazendo com que o meio cubra todo o fundo do poço;

Depois de 1 hora desprezar a solução de vírus contida na placa e colocar 2 mL de meio carboximetil celulose (2% de CMC, 2% de SFB e com os antibióticos Penicilina e anfotericina) em cada poço;

Levar as placas à estufa na presença de $\text{CO}_2/37^\circ\text{C}$ e aguardar a quantidade de dias para revelação dependendo do vírus utilizado.

Revelação e Titulação

Acrescentar Formol a 10% deixando por 2-3 horas para fixação das células;

Depois retirar o formol e CMC que estão na placa e lavar cuidadosamente;

Corar a placa com cristal violeta e deixar agir por 20 minutos;

Remover o excesso da solução corante e lavar em água corrente e deixar secar;

As placas podem ser contadas sem auxílio de microscópio e o título da infectividade é expresso pelo número de Unidades Formadoras de Placa/mL;

Dar preferência a poços entre 300-30 placas.

Contagem de Placa:

Controle: 0

10^{-1} : Incontáveis

10^{-2} : Incontáveis

10^{-3} : 709 placas

10^{-4} : 60 placas

10^{-5} : 5 placas

Cálculo em PFU:

PFU/mL: 60 (número de placas) X 10^{-4} (Fator de diluição que contou as placas) X 2,5 (1000/400)

$$\text{UFP/mL} = \frac{\text{número de focos contados} \times \text{recíproca diluição}}{\text{X padronização do volume inoculado para 1 (mL)}}$$

6.4 Teste de Neutralização por Redução de Placa (PRNT)

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

GERÊNCIA DE VIROLOGIA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO

Título:	Teste de Neutralização por Redução de Placa PRNT - ZIKV-YFV-CHIKV
Adaptado por:	Isa Piauilino

I. Objetivo:

Determinar a capacidade de neutralização de flavivírus e alfavírus.

II. Campo de Aplicação:

Laboratório de Cultura

III. Definições:

SFB	Soro Fetal Bovino
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
PBS	Tampão Fosfato-Salina (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PFU	Unidades Formadas de Placas (do inglês <i>Plaque-Forming Unit</i>)
°C	Graus Celsius
CO ₂	Dióxido de Carbono
mL	Mililitro
µL	Microlitro

IV. Responsabilidades:

Equipe do laboratório de Cultura: Realizar todo o procedimento prévio de assepsia do fluxo laminar antes de iniciar o procedimento e utilizar todos os EPIs (jaleco descartável, luvas, máscaras e touca).

V. Procedimentos:**Materiais necessários**

1. DMEM
2. Tripsina (0,25%)
3. PBS (Mg²⁺ +, Ca²⁺ + livre)
4. Penicilina-Streptomicina
5. Soro fetal bovino (FBS)
6. Frascos de cultura de tecidos
7. Placas de 6 poços
8. Carboximetilcelulose (CMC)
9. Tubos Falcons 50 mL
10. Ponteiras de vários tamanhos (ou seja, 10µL, 20µL, 200µL, 1000µL)
11. Células Vero (em crescimento ativo)
12. Estoque de vírus apropriado
13. Mesa, centrífuga de baixa velocidade
14. Fluxo laminar
15. Incubadora de cultura de tecido (37°C, 5% CO₂, umidificada)
16. Microscópio
17. Cristal Violeta
18. Banho-maria
19. Câmara de Neubauer

A. INATIVAÇÃO POR CALOR DE SFB E SOROS ALVOS

É importante que todos os soros utilizados para este ensaio sejam inativados.

Coloque o frasco de SFB e o soro dos indivíduos em banho maria a 56°C e incube por 60 minutos. No final do período de incubação, remova e armazene na temperatura apropriada (4° - 8° C é recomendado para armazenamento de curto prazo; -20°C para longo prazo).

B. PREPARAÇÃO DO MEIO

Em um frasco de 500 mL de DMEM, adicione 5mL de Pen/ Strep e anfotericina.

C. PREPARAÇÃO DE CARBOXIMETILCELULOSE A 1,5%

Uma garrafa de vidro com boca larga de 500mL completamente limpa, sem vestígios de detergente;

Adicione 10 gramas de carboximetilcelulose com um agitador magnético;

Autoclavar a 121° por 15 min;

Depois adicionar 500 mL de meio DMEM suplementado com SFB a 2% e enriquecido com penicilina/streptomicina e anfotericina B;

Deixar em overnight homogeneizando para ser diluído;

Depois colocar na geladeira por aproximadamente 2 dias.

D. PREPARAÇÃO DE CRISTAL VIOLETA

Coloque uma garrafa de 500 mL no fluxo;

Rotule adequadamente;

Adicione 5 gramas de cristal violeta, 50 mL de etanol absoluto e complete até 500 mL de água ultra-pura ou água destilada;

Misture bem e guarde à temperatura ambiente até novo uso

E. PREPARAÇÃO DE PLACAS DE CÉLULAS VERO

É essencial que as células Vero estejam na fase de crescimento logarítmico;

Antes de começar, desinfete a cobertura laminar;

Remova o frasco da incubadora a 37°C, coloque no fluxo laminar e aspire o meio completamente do frasco;

Lave com PBS 1X autoclavado por 2X uma garrafa média ou grande de células;

Retire bem o excesso de PBS com uma pipeta sorológica;

Coloque 1 mL de tripsina, deixe cobrir toda a monocamada da garrafa;

Leve a estufa a 37°C e deixe a tripsina agir por 3 min, em seguida bata a garrafa até que as células se soltem;

Coloque 10 mL de meio suplementado com SFB a 10% na garrafa para neutralizar o efeito da tripsina e em seguida ressuspender as células suavemente por 10 vezes com a pipeta sorológica;

Após a ressuspensão, passe para um falcon de 50 mL;

Homogeneize e transfira 10 μ L na câmara de newbauer para contagem;

Conte os 4 quadrantes, tire a média e multiplique por 10^4 (números de células em 1 mL);

Calcule na proporção de 400.000 células por poço para utilizar em placas de 6 poços;

Conte o número total de poços que será utilizado e some mais três poços como margem de erro;

Multiplique o total de poços por 400.000 células (número ideal de células por poço) para aproximadamente 70% de confluência no dia seguinte em placas de 6 poços;

Faça o cálculo em regra de três para encontrar o volume correspondente a quantidade de células que deve ser retirada da suspensão o suficiente para o número de poços desejados;

Em paralelo, calcule o volume final de DMEM 10% de SFB necessário para a confecção de todos os poços. Inicialmente, o número total de poços, mais três de margem de erro, deve ser multiplicado por 2 mL (volume de meio que é adicionado em cada poço);

Após a multiplicação deve ser subtraído o volume da suspensão de células para se obter o valor final de meio;

Em um falcon de 50 mL, coloque a quantidade de suspensão de células calculada e complete para o volume final com meio DMEM com SFB a 10%;

Distribua 2 mL em cada poço, espalhe bem as células com movimentos em forma de cruz para que os poços fiquem homogêneos;

As células atingirão 70-80 % de confluência em ~24 horas

F. CEPA DE VÍRUS

YFV Selvagem: Cepa wtYFV#3

G. VÍRUS ESTOQUE E DIAS DE INCUBAÇÃO

YFV: 50 PFU / mL - 7 dias de incubação

H. TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DE PLACA

Este ensaio é projetado para testes simultâneos de vários soros.

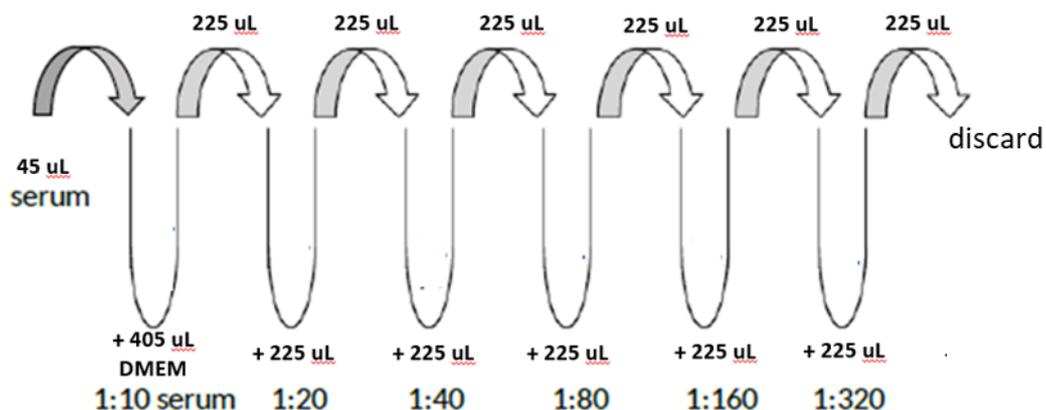
Todas as etapas são realizadas dentro de um fluxo laminar:

Prepare o vírus estoque na quantidade adequada de PFU /mL;

As diluições serão feitas em tubos ependorfs de 1,5 mL e depois aplicados em placas de 6 poços;

Adicionar ao primeiro ependorf 45 uL de soro neutralizado + 405 uL de meio DMEM (1:10). E em cada poço subsequente deve ter 225 uL de meio DMEM, no qual do primeiro poço aos demais a diluição seguirá passando 225 uL até o ependorf final com a diluição de 1:320;

Em cada diluição tudo deve ser bem homogeneizado, utilizando um vórtex e trocando a ponteira na passagem para cada ependorf.



Após a diluição do soro preparar a quantidade de meio e vírus proporcional a quantidade de placas:

Recomendado por volta de 100 PFU por poço;

É recomendado que o vírus seja diluído na base 10 (100 µL de vírus em 900 µL de meio) até um título próximo ao que será utilizado no experimento.

225µL de meio X ---poços (multiplicar pela quantidade de poços) + quantidade de vírus calculada para 450µL anteriormente.

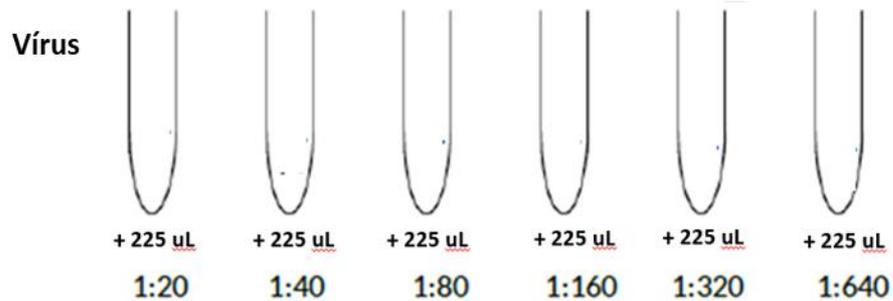
Ex:

Será feita uma PRNT em 8 placas de 6 poços, com adição de 100 PFU por poço;

O título estoque viral é $6,74 \times 10^6$ PFU/mL. Qual o cálculo?

- Primeiro se deve calcular o número de poços/tubos (8 placas x 6 poços) + 3 de margem de erro = 51 poços e tubos (mesmo número de tubos e poços);
- Depois descobrir com uma regra de três quanto do vírus colocar em um tubo para ter 100 PFU no poço final. Em 400 µL de meio usado para adsorção no poço preciso ter 100 PFU, mas no tubo tenho 450 µL, então: $450 \mu\text{L} \times 100 \text{ PFU} / 400 \mu\text{L} = 112,5 \text{ PFU/mL}$;
- Depois calcular a quantidade de PFUs para fazer todos os tubos: $51 \text{ tubos} \times 112,5 \text{ PFU} = 5737,5 \text{ PFU}$ ou $5,74 \times 10^3 \text{ PFU/mL}$;
- Diluir o vírus estoque na base 10 até o título ficar próximo de $5,74 \times 10^3$. O título original é $6,74 \times 10^6 \text{ PFU/mL}$, devo adicionar 100 µL de vírus estoque em 900 µL de meio em uma diluição "-1". O novo título será $6,74 \times 10^5 \text{ PFU/mL}$. O vírus ainda pode ser diluído mais duas vezes da mesma forma nas diluições "-2" ($6,74 \times 10^4 \text{ PFU/mL}$) e "-3" ($6,74 \times 10^3 \text{ PFU/mL}$);
- Usando a diluição -3 ($6,74 \times 10^3 \text{ PFU/mL}$) será feita a conta de quanto de vírus utilizar: $5,74 \times 10^3 \text{ PFU} \times 1000 \mu\text{L} / 6,74 \times 10^3 \text{ PFU/mL} = \sim 852 \mu\text{L}$ de vírus da diluição -3;
- Depois calcular o volume que devo ressuspender os 852 µL de vírus para fazer todos os poços: $250 \mu\text{L}$ volume por tubo x 51 tubos – $852 \mu\text{L} = 11 \text{ mL}$ e $898 \mu\text{L}$ de meio devem ser adicionados aos 852 µL de vírus na diluição -3 em um falcon de 50 mL.

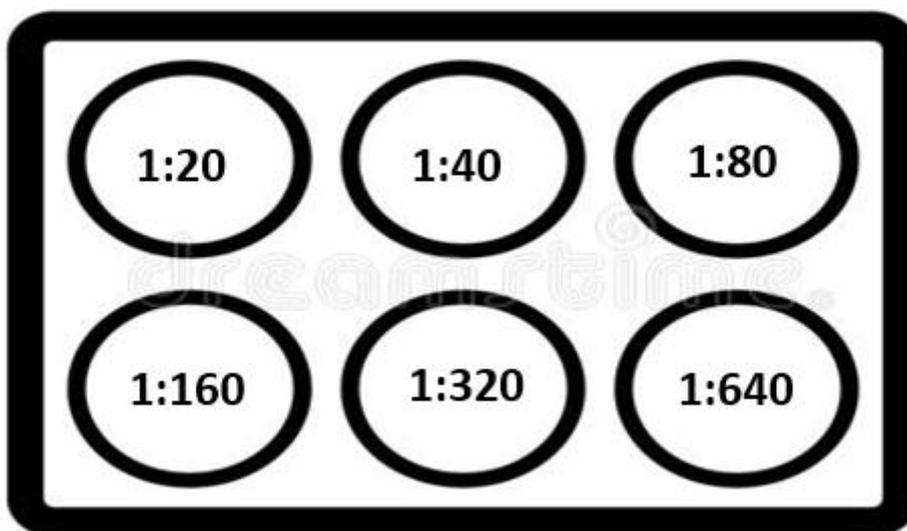
Em seguida vortexar bem e distribuir 225µL em cada eppendorf, obtendo inicialmente uma diluição de 1:20 a 1:640



Após adicionar a quantidade de vírus na amostra diluída, vortexar novamente e incubar na estufa durante uma hora a 37°C e homogeneizar a cada 10 minutos manualmente.

Depois identificar as placas com a numeração das amostras correspondentes confeccionadas no dia anterior e lavar com PBS.

Retirar bem o PBS e colocar 400µL das amostras incubadas nas devidas placas de acordo com as diluições.



Deixar incubar por mais uma hora a 37°C na estufa com CO₂ e homogeneizar a cada 10 minutos balançando as placas suavemente.

No final do período de incubação de 1 hora, remova as placas da estufa, despreze a mistura (soro/vírus) contidas nos poços e adicione 2 mL de DMEM com carboximetilcelulose 2% e 2% de SFB;

Leve as placas novamente a estufa e espere alguns dias dependendo do vírus para revelação.

I. FIXAÇÃO E COLORAÇÃO DO ENSAIO PRNT

Remova as placas da incubadora e adicione 2 ml de formol a 10%, deixando fixar por 3 horas ou mais em temperatura ambiente sobre a bancada;

Após a fixação desprezar o formol em descarte apropriado e lavar a placa em fio de água;

Em seguida corar a placa colocando o cristal violeta diluído e após 20 min lavar levemente em água corrente e deixar secar;

Depois tirar a média dos controles de vírus e fazer a regra de três de acordo com a porcentagem de PRNT proposto.

Referências:

- Terzian ACB, Zini N, Sacchetto L, Rocha RF, Parra MCP, Del Sarto JL, Dias ACF, Coutinho F, Rayra J, da Silva RA, Costa VV, Fernandes NCCA, Réssio R, Díaz-Delgado J, Guerra J, Cunha MS, Catão-Dias JL, Bittar C, Reis AFN, Santos INPD, Ferreira ACM, Cruz LEAA, Rahal P, Ullmann L, Malossi C, Araújo JP Jr, Widen S, de Rezende IM, Mello É, Pacca CC, Kroon EG, Trindade G, Drumond B, Chiaravalloti-Neto F, Vasilakis N, Teixeira MM, Nogueira ML. Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. *Sci Rep.* 2018 Oct 30;8(1):16034.
- Vasilakis N, Durbin AP, Travassos Da Rosa APA, Munoz-Jordan JL, Tesh RB, Weaver SC. Short Report: Antigenic Relationships between Sylvatic and Endemic Dengue Viruses. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79(1):128–32.
- Vasilakis N, Shell EJ, Fokam EB, Mason PW, Hanley KA, Estes DM, et al. Potential of ancestral sylvatic dengue-2 viruses to re-emerge. *Virology.* 2007 Feb 20;358(2):402–12.

- WHO. Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. Geneva; 2007.
- Russell PK, Nisalak A, Sukhavachana P, Vivona S. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. J Immunol. 1967 Aug 1;99(2):285–90.

7. ANEXOS

7.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Características epidemiológicas, clínicas, nutrológicas, virológicas, histopatológicas e imunológicas da infecção por vírus Zika em gestantes com doença exantemática aguda e sua relação com a microcefalia ou eventuais desfechos adversos em Manaus, Amazonas

Pesquisador: MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 60168216.2.0000.0005

Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

Patrocinador Principal: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.375.813

Apresentação do Projeto:

Vide Parecer Substanciado de nº 1806030 emitido em 04/11/2016.

Objetivo da Pesquisa:

Vide Parecer Substanciado de nº 1806030 emitido em 04/11/2016.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Vide Parecer Substanciado de nº 1806030 emitido em 04/11/2016.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Vide Parecer Substanciado de nº 1806030 emitido em 04/11/2016.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide Parecer Substanciado de nº 1806030 emitido em 04/11/2016.

Em relação às alterações realizadas no PROJETO PRINCIPAL ZIKA_GESTANTES, readequados TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e NO TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.375.813

Recomendações:

NENHUMA

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após a avaliação das alterações proposta pela presente EMENDA, terem sido readequadas nos TERMOS DE CONSENTIMENTO E DE ASSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDOS, há manifesto favorável a APROVAÇÃO.

Considerações Finais a critério do CEP:

A presente Emenda (E1) está APROVADA e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios, parciais e o final, do estudo conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1005023_E1.pdf	27/09/2017 14:04:23		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Zika_Gestantes_CEP_v260917_final.doc	27/09/2017 13:47:04	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Zika_Gestantes_CEP_v260917_alteracoes_realcadas.doc	27/09/2017 13:46:44	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ZIKA_v260917_alteracoes_realcadas.doc	27/09/2017 13:22:34	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_responsavel_ZIKA_v260917_final.pdf	27/09/2017 13:22:18	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_responsavel_ZIKA_v260917_alteracoes_realcadas.doc	27/09/2017 13:22:04	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_ZIKA_v260917_final.pdf	27/09/2017 13:21:04	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_ZIKA_v260917_alteracoes_realcadas.doc	27/09/2017	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.375.813

Assentimento / Justificativa de Ausência	adas.doc	13:20:46	GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ZIKA_v260917_final.pdf	27/09/2017 13:17:16	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_PROTOCOLO_DE_PESQUISA_ZIKA_v2.pdf	19/10/2016 16:05:39	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_responsavel_PROTOCOLO_DE_PESQUISA_ZIKA_v2.pdf	19/10/2016 16:05:11	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PROTOCOLO_DE_PESQUISA_ZIKA_v2.pdf	19/10/2016 16:03:48	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
Outros	Resposta_CEP_Zika_Gestantes.pdf	19/10/2016 16:00:36	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_responsavel_PROTOCOLO_DE_PESQUISA_ZIKA.pdf	20/09/2016 18:14:42	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_responsavel_aminocentese_PROTOCOLO_DE_PESQUISA_ZIKA.pdf	20/09/2016 18:14:30	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PROTOCOLO_DE_PESQUISA_ZIKA.pdf	20/09/2016 18:12:09	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_autopsia_PROTOCOLO_DE_PESQUISA_ZIKA.pdf	20/09/2016 18:11:56	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_aminocentese_PROTOCOLO_DE_PESQUISA_ZIKA.pdf	20/09/2016 18:11:43	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_PROTOCOLO_DE_PESQUISA_ZIKA.pdf	20/09/2016 18:11:32	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
TCLE / Termos de	TALE_aminocentese_PROTOCOLO_DE	20/09/2016	MARIA DAS	Aceito

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.375.813

Assentimento / Justificativa de Ausência	E_PESQUISA_ZIKA.pdf	18:11:17	GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Zika_Gestantes_CEP.doc	19/09/2016 16:49:42	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
Outros	Carta_Anuencia_FVS_AM.pdf	14/09/2016 14:58:29	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
Outros	Carta_Anuencia_DENPE.pdf	12/09/2016 17:44:20	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
Outros	Carta_Anuencia_DAM.pdf	12/09/2016 17:43:48	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_gest.pdf	12/09/2016 17:43:16	MARIA DAS GRAÇAS COSTA ALECRIM	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 10 de Novembro de 2017

Assinado por:
Marilaine Martins
(Coordenador)

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br