

Maria Betânia Silva de Oliveira Marchetti

**Desenvolvimento e validação de um ensaio imunoenzimático
alternativo para quantificação de anticorpos IgG contra o vírus da
Febre Amarela**

Rio de Janeiro

2016

Maria Betânia Silva de Oliveira Marchetti

**Desenvolvimento e validação de um ensaio imunoenzimático alternativo para
quantificação de anticorpos IgG contra o vírus da Febre Amarela**

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Orientador (a): Prof^o. Dr. Leonardo Lucchetti Caetano da Silva

Co-orientador (a): Dr^a. Denise Cristina de Souza Matos

Rio de Janeiro

2016

M317d Marchetti, Maria Betânia Silva de Oliveira

Desenvolvimento e validação de um ensaio imunoenzimático alternativo para quantificação de anticorpos IgG contra o vírus da Febre Amarela./Maria Betânia Silva de Oliveira Marchetti. - Rio de Janeiro, 2016.

XiX, 102f.: il. 30cm

Orientadores: Dr. Leonardo Lucchetti Caetano da Silva
Dr^a. Denise Cristina de Souza Matos

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2016.

Bibliografia: f. 72-82

1.Febre amarela. 2.Vacinação. 3.Imunização. 4. Desenvolvimento de Método. I.Título

CDD 615.1

Maria Betânia Silva de Oliveira Marchetti

**Desenvolvimento e validação de um ensaio imunoenzimático alternativo para
quantificação de anticorpos IgG contra o vírus da Febre Amarela.**

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos – Fundação Oswaldo Cruz

Aprovada em: ___/___/___.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Joseli Maria da Rocha Nogueira
Departamento de Ciências Biológicas- ENSP – Fiocruz

Dr^a. Sheila Maria Barbosa de Lima
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Fiocruz

Prof. Dr. Damião Carlos Moraes dos Santos – Universidade Estácio de Sá

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu esposo Carlos Alberto de Oliveira Marchetti Júnior e a minha filha Giovana de Oliveira Marchetti, por seu amor e companheirismo durante esses anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus por ter sido meu companheiro incondicional e confidente em todos os momentos da minha vida. Ao meu esposo Carlos, por seu amor e carinho, permanecendo ao meu lado durante todo esse tempo, sendo meu companheiro, aturando-me e compreendendo meus defeitos e minhas faltas. À minha pequena filha Gi por ter compreendido a ausência da mamãe. À minha mãe, Genilda, por seu amor absoluto, por sua dedicação e carinho. Mulher batalhadora e sempre de coração aberto para ajudar. Por mais que eu escreva, não vou conseguir traduzir em palavras tudo que sinto pela senhora. Muito obrigado e ao meu pai, Ecidrone. Foi preciso passar por tudo isso, para chegar aqui hoje e falar que valeu a pena, muito obrigado. À minha sogra Sandra, que ofereceu todo o apoio, em ficar com a Gi. Sei que tivemos problemas, mas nada é maior do que o amor e a gratidão que sinto pela senhora. À minha Célula, grupo de oração da igreja, em que me sustentaram em orações e me fortaleceram em palavras. À minha co-orientadora, Dra. Denise Matos, pessoa que confiou em meu potencial e deu a oportunidade de realizar esse trabalho. E que também teve paciência durante esses anos para acompanhar todos os passos deste projeto e por seu *know-how* fator fundamental para a conclusão deste trabalho. A toda a equipe do LATIM (Laboratório de Tecnologia Imunológica) (Andrea, Camila, Jane, Patrícia, Alessandro, Marcelo e Tamires) que ajudaram-me com os ensaios. À minha ex-chefe Ester que foi a grande incentivadora deste trabalho, sempre acreditando em mim. Aos amigos que fiz na SEVAN (Seção de Validação Analítica) (Mariana, Leila, Victor, Bruno e Luiz) que foram grandes parceiros dividindo comigo as minhas ansiedades.

Ao meu orientador, Professor Dr. Leonardo Lucchetti, por seu apoio e amizade, além de sua dedicação, competência e especial atenção nas revisões e sugestões, abrindo-me um olhar crítico nas melhorias deste trabalho.

A todos os amigos e colegas de trabalho da DIAUT (Divisão de Auditoria e Treinamento) e demais amigos de Bio-Manguinhos, pela ajuda, força e pelos ensinamentos. Aos meus familiares, amigos e todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Mais uma vez tenho ouvido Deus dizer que o poder é dele e o amor, também.
Tu ó Senhor, recompensas cada um de acordo com o que faz.

Salmos de Davi 62:11.

RESUMO

MARCHETTI, Maria Betânia Silva de Oliveira. *Desenvolvimento e validação de um ensaio imunoenzimático alternativo para quantificação de anticorpos IgG contra o vírus da Febre Amarela*. 2016. 101f. Dissertação Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

O vírus atenuado da febre amarela, subcepa 17DD, é utilizado por Bio-Manguinhos para a produção da vacina contra a febre amarela. Esta vacina tem sido empregada há anos para a imunização humana com um excelente histórico de eficácia e segurança. Para a quantificação dos títulos de anticorpos neutralizantes produzidos como resposta imunológica a vacinação é utilizada o método “ouro” PRNT - Teste de neutralização por redução de placas de lise (*Plaque Reduction Neutralization Test*). Entretanto, este método possui algumas particularidades que precisam ser consideradas, tais como alto custo analítico devido ao tempo requerido para a emissão de um resultado, pessoal eficientemente treinado, necessidade de equipamentos e insumos específicos não sendo, portanto, facilmente passível de uso em rotina severa ou sua utilização em grande escala. Por isso, justifica-se a necessidade de desenvolvimento de um método alternativo para a quantificação desses anticorpos. Para a implementação deste novo método alternativo torna-se necessário o desenvolvimento de um método que permita quantificar anticorpos antivírus febre amarela em amostras de soros.

O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento e validação de um ensaio imunoenzimático para quantificação de anticorpos contra o vírus da Febre Amarela presente no soro de um grupo de indivíduos brasileiros imunizados com a vacina 17DD produzida em Bio-Manguinhos. Para este propósito, foram obtidas partículas virais da subcepa 17DD, a partir de culturas de células Vero, o anticorpo monoclonal 2D12 específico para a proteína E do envelope do vírus da FA e o soro padrão preparado *in house* utilizado como controle positivo (M7/100) foi obtido de macacos Rhesus (*Macaca mulata*). Foram utilizados diferentes soros amostrais, os quais foram titulados pelos métodos de PRNT e ViBI, onde foi possível realizar a comparação dos métodos, para avaliar a equivalência dos resultados, assim como foram realizados o estudo da validação, com os testes de seletividade, curva de calibração, precisão, exatidão, limite de quantificação e limite de detecção. Ficou demonstrado que a comparação entre os métodos ViBI e PRNT foi equivalentemente aceitável, já que quando comparados soros amostrais dos mesmos indivíduos, os resultados tiveram uma correlação alta de acordo com a avaliação realizada pelas análises estatísticas Spearman, Mann Whitney e Wilcoxon.

No estudo da validação, demonstrou-se que o método ViBI pode ser utilizado para titular anticorpos que inibem a ligação do vírus da febre amarela em indivíduos sabidamente vacinados com a vacina de Febre Amarela.

Palavras-chave: Febre amarela. Vacinação. Imunização. Anticorpos. Desenvolvimento de método. Validação de métodos imunobiológicos.

ABSTRACT

MARCHETTI, Maria Betânia Silva de Oliveira. *Desenvolvimento e validação de um ensaio imunoenzimático alternativo para quantificação de anticorpos IgG contra o vírus da Febre Amarela*. 2016. 101f. Dissertação Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

The yellow fever attenuated virus, sub 17DD strain is used by Bio-Manguinhos for the production of a vaccine against yellow fever. This vaccine has been used for years for human immunization with an excellent traceability of efficacy and safety. For quantification of neutralizing antibodies produced as immunological response to immunization method is used "gold" PRNT - Plaque Reduction Neutralization Test). However, this method has some peculiarities that need to be considered, such as high cost analytical due to the time, efficiently trained staff need specific equipment and supplies not being therefore easily capable of use in severe routine or its use on a large scale. Therefore, it justifies the need to develop an alternative method for the quantification of these antibodies. To implement this new alternative method, it is necessary to develop a method for quantifying antibodies anti yellow fever virus in the serum samples.

This study aimed at the development and validation of an immunoassay for the measurement of antibodies against the virus of yellow fever present in the serum of a group of Brazilian individuals immunized with the Brazilian 17DD substrains vaccine produced by Bio-Manguinhos. For this purpose, Brazilian YF17DD substrains were obtained from Vero cells cultures, monoclonal antibody specific 2D12 to the envelope E protein of FA virus and standard serum prepared in house used as positive control (M7 / 100) was obtained from rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). Different sample sera were used, which were titrated by methods PRNT and ViBI where it was possible to compare methods, to assess the equivalence of results as were performed to study the validation, the selectivity tests, curve calibration, precision, accuracy, limit of quantification and detection limit. It demonstrated that the comparison between the methods ViBI and PRNT was equivalently acceptable, as compared sampling serum from the same individuals, the results had a high correlation according to the assessment made by the statistical analyses of Spearman, Mann Whitney and Wilcoxon.

In the validation study demonstrated that the ViBI method can be used for titration of antibodies in individuals vaccinated with the known yellow fever vaccine.

Keywords: Yellow fever. Vaccination. Immunization. antibodies. Development method. Immunobiological methods Validation.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	vi
INDICE DE FIGURAS	ix
INDICE DE TABELAS	x
LISTA DE QUADROS.....	xi
LISTA DE GRÁFICOS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
1.INTRODUÇÃO	1
1.1. A Febre Amarela.....	1
1.2. Distribuição epidemiológica da doença	3
1.3. Prevenção e controle da doença	5
1.4. Características gerais do vírus da Febre Amarela	6
1.5. A vacina contra a Febre Amarela.....	7
1.6. Imunogenicidade pós-vacinal	10
1.6.1. Efetividade da vacina	13
1.7. Eventos adversos associados à vacina de Febre Amarela	14
1.8. Segurança das vacinas.....	16
1.9. Controle de qualidade da Vacina de Febre Amarela	17
1.10. Ensaios para detecção viral e avaliação da imunogenicidade.....	19
1.10.1. Isolamento e quantificação do vírus da Febre Amarela.....	19
1.10.2. Ensaios sorológicos para avaliação da imunogenicidade	21
1.11. Desenvolvimento de métodos alternativos (passado, futuro e avanços) .	24
1.12. Conceitos básicos na validação de um teste bioanalítico.....	25
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	30

3.1. Objetivo geral	30
3.2. Objetivos específicos.....	30
4. METODOLOGIA	31
4.1. Materiais e métodos	31
4.1.1. Soros amostrais	31
4.1.2. Soro padrão <i>In House</i>	32
4.1.3. Anticorpo monoclonal 2D12.....	32
4.1.4. Anticorpo 2D12 conjugado com HRP	32
4.1.5. Vírus 17DD (FA)	33
4.2. Desenvolvimento do Teste de Inibição da ligação do Vírus (ViBI)	34
4.2.1. Procedimento para o teste de quantificação de anticorpos IgG anti Febre Amarela	34
4.2.2. Cálculos dos títulos das amostras	38
4.2.3. Curva de avaliação de positividade	39
4.2.4. Comparação dos resultados obtidos pelos métodos PRNT e ViBI.....	39
4.2.5. Avaliação da validade/acurácia do método ViBI	40
4.3. Validação do método de ViBI	40
4.3.1. Protocolo de validação bioanalítica.....	40
4.3.2. Seletividade	41
4.3.3. Curva de calibração	41
4.3.4. Precisão	41
4.3.4.1. Intracorrida	41
4.3.4.2. Intercorrida	42
4.3.5. Exatidão	42
4.3.5.1. Intracorrida	42
4.3.6. Limite de detecção	43

4.3.7. Limite de quantificação.....	43
4.4. Análises estatísticas	44
4.5. Critério de aceitação	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1. Curva de avaliação de positividade.....	45
5.2. Avaliação dos títulos de IgG pelos métodos PRNT e ViBI.....	47
5.3. Validade/acurácia do método ViBI.....	52
5.4. Validação do método ViBI	54
5.4.1. Seletividade	54
5.4.2. Curva de calibração	56
5.4.3. Precisão	59
5.4.4. Exatidão	64
5.4.5. Limite de quantificação e detecção	66
6. CONCLUSÃO	70
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de transmissão da Febre Amarela.	1
Figura 2: Regiões do Brasil com recomendação da vacina.	4
Figura 3: Modelo esquemático da partícula viral (Flavivírus). Esquerda: vírus imaturo, direita: vírus maduro.....	6
Figura 4: Histórico das passagens da cepa selvagem Asibi e derivação das cepas vacinais do vírus 17D.	8
Figura 5: Vantagens da utilização do ELISA.	29
Figura 6: Esquema de distribuição dos insumos na placa de fundo chato.	35
Figura 7: Esquema para o procedimento de dosagem de anticorpos IgG contra FA.	36
Figura 8: Esquema da ligação positiva e ligação negativa para o método ViBI.	37
Figura 9: Esquema da ligação positiva e ligação negativa para o método PRNT.	38
Figura 10: Resumo da avaliação da concentração de anticorpos IgG pelos métodos PRNT e ViBI.	52

INDICE DE TABELAS

Tabela 1: Doses aplicadas por faixa etária, doses acumuladas, cobertura vacinal e população a ser vacinada no Brasil 2000 a 2009).....	9
Tabela 2: Testes realizados na vacina de Febre Amarela.	18
Tabela 3: Especificações da vacina de febre amarela Bio-Manguinhos.	19
Tabela 4: Resumo da aplicabilidade de cada teste estatístico	40
Tabela 5: Avaliação da validade/acurácia do ViBI.....	53
Tabela 6: Dados para avaliação da seletividade.	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Eventos adversos da vacina de Febre de Amarela.	15
Quadro 2: Propriedades de alguns flavivírus utilizados frequentemente nos protocolos de sorodiagnóstico.	23
Quadro 3: Esquema de repetições para a precisão intracorrida.	42
Quadro 4: Esquema de repetições para a exatidão intracorrida.	43
Quadro 5: Critérios de aceitação da validação do método de ViBI.	44
Quadro 6: Resultados dos valores de quantificação da curva de positividade.....	46
Quadro 7: Valores em DO da curva de calibração, resultados obtidos pelo método ViBI.....	57
Quadro 8: Definição do valor nominal de cada concentração da curva.	59
Quadro 9: Estudo da precisão intracorrida.	60
Quadro 10: Estudo da precisão intercorrida.	62
Quadro 11: Estudo da exatidão intracorrida.	64
Quadro 12: Limite de quantificação e limite de detecção.	66
Quadro 13: Compilado dos resultados encontrados no estudo de validação.....	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Curva de avaliação de positividade.	45
Gráfico 2: Ponto de corte estabelecido em 30 soros de indivíduos pós-vacinados...47	47
Gráfico 3: PRNT – Comparação dos títulos de anticorpos IgG pré e pós-vacinação.	48
Gráfico 4: ViBI – Comparação dos títulos de anticorpos IgG pré e pós-vacinação. ...49	49
Gráfico 5: Correlação entre os métodos de ViBI e PRNT em soros pré e pós- vacinados.	50
Gráfico 6: Comparação entre os títulos de IgG testados pelos métodos ViBI e PRNT.	51
Gráfico 7: Curva de calibração.	58
Gráfico 8: Dispersão dos valores encontrados no estudo de precisão intracorrida...61	61
Gráfico 9: Dispersão dos valores encontrados no estudo de precisão intercorrida...63	63
Gráfico 10: Comparação dos valores encontrados no estudo de exatidão intracorrida.	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCL	célula B de linfoma
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio (do inglês <i>Biochemical Oxygen Demand</i>)
BPF	Boas práticas de fabricação
BR	Brasil
BSA	Albumina bovina
BSL	Laboratório de Biossegurança
C	Proteína de capsídeo
C1QA	Complemento Componente 1, Q Subcomponente, A
CCR	Receptor de quimiocinas
CD	Grupamento de diferenciação (cluster of differentiation)
CIEVA	Centro de Informações Estratégicas em Vigilância em Saúde
CQ	Controle de qualidade
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQB	Controle de qualidade de baixa concentração
CQD	Controle de qualidade de diluição
CQM	Controle de qualidade de média concentração
CSF	Fator estimulador de colônias
CV	Coefficiente de variação
CXCR	Receptor de quimiocinas
DCs	Células dendríticas
DEGAQ	Departamento de garantia da qualidade
DI	Documento interno
DL 50	Dose Letal 50 (dose que leva à morte de 50% de uma população)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (desoxirribonucleic acid)
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
E	Proteína de envelope viral ou do vírus
EAPV	Eventos Adversos Pós-Vacinação
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do inglês <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
ERP	Erro padrão relativo
FA	Febre amarela
FAS	Febre amarela silvestre
FAU	Febre amarela urbana
FC	Fixação de complemento
Fc	Fragmento cristalizável
FDA	Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HLA	Antígenos leucocitários humanos
HRP	Enzima peroxidase rábano
IC	Intervalo de confiança
IFN	Interferon

Ig	Imunoglobulina
IH	Inibição da hemaglutinação
IL	Interleucina
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Ki67	Marcador de proliferação celular
LAMEV	Laboratório de metrologia e validação
LATAM	Laboratório de anticorpos monoclonais
LATEV	Laboratório de tecnologia virológica
LATIM	Laboratório de imunologia de Bio-Manguinhos
LIQ	Limite inferior de quantificação
LSQ	Limite superior de quantificação
M	Proteína de membrana viral ou do vírus
MAC-ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with capture of IgM antibodies</i> (ensaio imunoenzimático com captura de anticorpo IgM)
MARCO	Receptor de macrófago com estrutura de colágeno (Expression of macrophage receptor with collagen structure)
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
MLD	Dose letal media
MPT	<i>Mouse protection test</i>
MS	Ministério da Saúde
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
NK	<i>Natural Killer</i>
NS-	Proteína não estrutural, (do inglês non structural)
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação de cadeia de polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Padrão interno
PNI	Programa Nacional de Imunização
PrM	Pré membrana
PRNT	Teste de neutralização por redução de placas de lise (do inglês <i>Plaque Reduction Neutralization Test</i>)
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RDC	Resolução de diretoria colegiada
RNA	Ácido ribonucléico (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>)
3Rs	<i>Reduction, refinement, replacement</i>
RT-PCR	Reação de cadeia de polimerase em tempo real
SEAPV	Sistema de Vigilância de Eventos Adversos Pós-Vacinação
SERPING1	Gene inibidor de C1 esterase
SEVAN	Seção de validação analítica
SFB	Soro fetal bovino
SGQ	Sistema de gestão da qualidade
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
Tc	Linfócito T citotóxico
TLR	Receptor toll like
TMB	Tetrametilbenzidina
TN	Teste de neutralização
TNF	Fator de necrose tumoral
ToBI	<i>Toxin binding inhibition (ligação de inibição da toxina)</i>

UF	Unidade federativa
UFAW's	<i>The Universities Federation for Animal Welfare</i>
UFP	Unidade formadora de placas
UI	Unidade internacional
USAMRIID	United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases
VDTEC	Vice-diretoria de desenvolvimento tecnológico
ViBI	<i>Virus binding inhibition (Ligação de inibição do vírus)</i>
VQUAL	Vice-diretoria de qualidade
WHO/ OMS	<i>World Health Organization/ Organização Mundial da Saude</i>

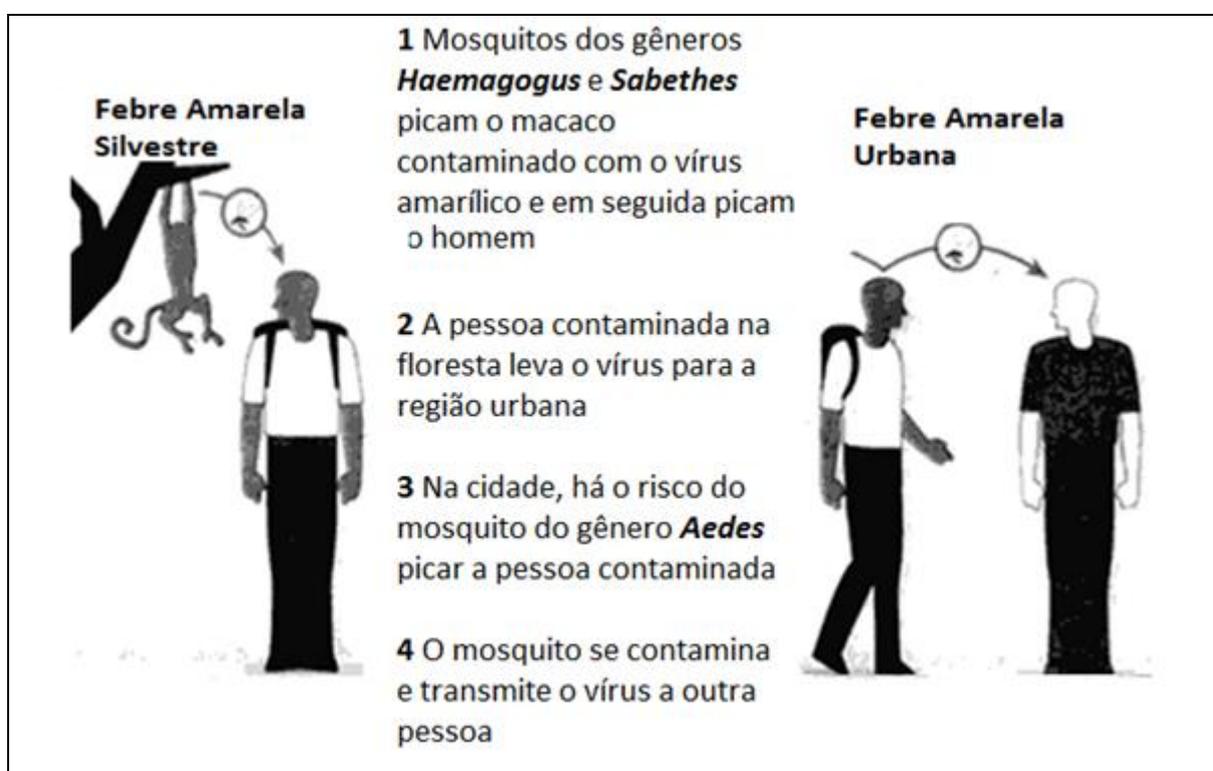
1.INTRODUÇÃO

1.1. A Febre Amarela

A Febre Amarela (FA) é uma doença infecciosa não-contagiosa causada por um arbovírus, mantido em ciclos silvestres em que macacos atuam como hospedeiros amplificadores e mosquitos dos gêneros *Aedes* na África, e *Haemagogus* e *Sabethes* na América, são os transmissores. O vírus da febre amarela pertence ao gênero Flavivírus da família Flaviviridae (do latim *flavus* = amarelo) (Vasconcelos, 2003).

Existem dois ciclos de transmissão da FA que estão representados na figura 1: urbana ou clássica e a silvestre. A transmissão urbana acontece através da picada do mosquito *Aedes aegypti* infectado com o vírus que, por se reproduzir em águas limpas, tem favorecida sua concentração em áreas urbanas (Silva, 2007).

Figura 1: Ciclo de transmissão da Febre Amarela.



Adaptado de: http://www.libertaria.pro.br/d_ressurgentes_intro.htm

A Febre Amarela Silvestre (FAS) é uma doença endêmica em primatas não humanos, transmitida por mosquitos *Aedes*, *Haemagogus* e *Sabethes*, que vivem nas florestas úmidas. O mosquito pica o macaco contaminado com o vírus amarelo e em seguida pica o homem, carregando o vírus aos centros urbanos (Brasil, 2008).

O ciclo silvestre da doença torna sua erradicação impossível, já que o controle sanitário do mosquito é um grande desafio acarretando com isso a utilização da vacina indefinidamente (WHO, 2005).

A doença sempre foi uma preocupação das autoridades sanitárias, pois é a causa de grande número de morbidades e letalidades nas regiões tropicais da América do Sul e da África. No século XVII, com o surgimento da doença, milhares de pessoas foram acometidas em epidemias urbanas nesses continentes. Apesar da existência, desde 1937, de uma vacina segura e eficiente contra a FA, essa doença tem se apresentado como um problema de saúde pública, principalmente nos países tropicais, devido às ótimas condições do meio ambiente, que propiciam o desenvolvimento e a propagação dos mosquitos vetores da doença (Monath, 2005).

O primeiro caso apresentado de uma doença semelhante à FA foi registrado em um manuscrito Maia de 1648 em Yucatan, México. Na Europa, a apresentação da doença foi antes dos anos de 1700, porém só em 1730, na Península Ibérica, apareceu a primeira epidemia dizimando 2200 vidas; já no Brasil, a FA apareceu pela primeira vez em Pernambuco, no ano de 1685, onde ocorreu a doença durante 10 anos endemicamente (Ferreira et al., 2011).

A FA foi uma das doenças mais terríveis nos últimos tempos e, mesmo após o desenvolvimento da vacina, tem aparecido ocasionando casos isolados ou pequenas epidemias nas áreas endêmicas, as quais ainda promovem impacto na saúde pública e, conseqüentemente, preocupações pelas autoridades (Simões, 2011).

No período de 2000 a 2010 o Brasil viveu os piores anos da doença, registrando 324 casos de FAS, dos quais 155 evoluíram para o óbito. Os piores anos de transmissão ocorreram em 2003, 2007, 2008 e 2009, com confirmação de 65, 13, 46 e 47 casos, respectivamente. Esses números demonstram o potencial risco que a doença representa, considerando a expansão territorial registrada nos últimos anos (Brasil, 2011).

1.2. Distribuição epidemiológica da doença

As últimas epidemias haviam ocorrido, no Brasil, no Acre, em 1942, e em Trinidad e Tobago, em 1954 e em 1958, logo em seguida o Brasil e outros países americanos foram oficialmente declarados livres do *Aedes aegypti*. Uma década após este período e a aparente tranquilidade da vigilância epidemiológica com a despreocupação do risco representado pela FA urbana, recomeçaram a surgir relatos de casos da doença, o primeiro em 1967 surgindo no Pará. No ano seguinte, foi reencontrado também em São Luís do Maranhão e em dois ou três municípios próximos. Anos depois, em 1976, um novo caso surgiu na Bahia, chegando às cidades do Rio de Janeiro e Natal em 1977, aparecendo também em 1980, estando presente em 226 municípios seis anos depois (Benchimol, 2001).

Nas últimas décadas, a ocorrência da FA tem sido registrada em 9 países: Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Peru, Venezuela, Guiana Francesa, Paraguai e Argentina (Brasil, 2010(a)).

Na América do Sul observa-se cerca de 300 casos anuais; na África, são observados mais de 5000 casos anuais, isto é, cerca de 90% das notificações feitas à Organização Mundial de Saúde (OMS) são de origem africana. Em alguns países da África há transmissão urbana da doença (Silva, 2007).

O Brasil é o país que possui a maior área endêmica de FAS no mundo, seguida pela bacia do rio Congo, na África. No Brasil, as áreas com recomendação da vacinação incluem: Maranhão, Tocantins, Bahia, Pará, Amapá, Roraima, Amazonas, Acre, Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal, Goiás, parte de São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e parte do Paraná (Brasil, 2011). Na figura 2 foram mapeadas as regiões do Brasil onde a vacinação contra a FA é recomendada.

Figura 2: Regiões do Brasil com recomendação da vacina.



Fonte: Brasil, 2011

No Brasil estão definidas quatro áreas epidemiologicamente distintas: **endêmica** ou **enzoótica** (regiões Norte, Centro Oeste e estado do Maranhão), onde o vírus se propaga continuamente através de grupos de macacos, propiciando o surgimento de casos em humanos; **epizoótica** ou **de transição**, onde ocasionalmente ocorrem epizootias de macacos, geralmente seguidas de casos humanos: abrange uma faixa que vai da região centro-sul do Piauí, oeste da Bahia, noroeste de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul; área **indene**, que onde não há evidências da circulação do vírus amarelo e abrange os estados da região nordeste, sudeste e sul; e área **indene de risco potencial**: zonas de maior risco para circulação viral, adjacentes e com ecossistemas semelhantes à área de transição, compreendendo os municípios do sul de Minas Gerais e da Bahia e a região centro-norte do Espírito Santo (Benchimol, 2001).

No período de julho de 2012 a junho de 2013 foi realizado um estudo descritivo para conhecimento dos casos de FA em humanos, baseado por notificações realizadas ao Centro de Informações Estratégicas em Vigilância em Saúde - CIEVA, notificações à área técnica (Ministério da Saúde). Neste período foram observados 279 casos humanos suspeitos, sendo a região Sudeste com o maior número

observado de 143 (51,3%), seguida das regiões Centro-Oeste com 52 (18,6%), e Sul, com 49 (17,6%) (Brasil, 2014).

1.3. Prevenção e controle da doença

Em 2001, foi criado o Plano de Intensificação das Ações de Prevenção e Controle da Febre Amarela designada pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) com a finalidade de diminuir os casos de FAS e evitar a ocorrência da transmissão urbana, já erradicada desde 1942 (Silva, 2008).

Para prevenir a doença, duas importantes iniciativas são essenciais: a primeira é o controle de mosquitos vetores e a segunda, a vacinação. O controle de mosquitos é a medida básica para conter a doença e as iniciativas empregadas devem ser: evitar a picada de mosquitos com o uso de repelentes, mosquiteiros e telas protetoras; eliminação de criadouros, tendo como método de primeira escolha o controle mecânico como remoção e destruição através da vedação ou eliminação de qualquer tipo de depósito de água; evitar o acúmulo de lixo para reduzir os possíveis criadouros de mosquitos; controle químico das larvas do mosquito vetor (larvicidas); e campanhas de educação em saúde informando às comunidades sobre as doenças transmitidas por mosquitos, bem como as medidas adequadas para combatê-los (Simões, 2011; Romanos, 2008).

A vacinação, a segunda iniciativa, é o método mais eficiente na prevenção de doenças infecciosas (Benchimol, 2001; Monath et al., 2011).

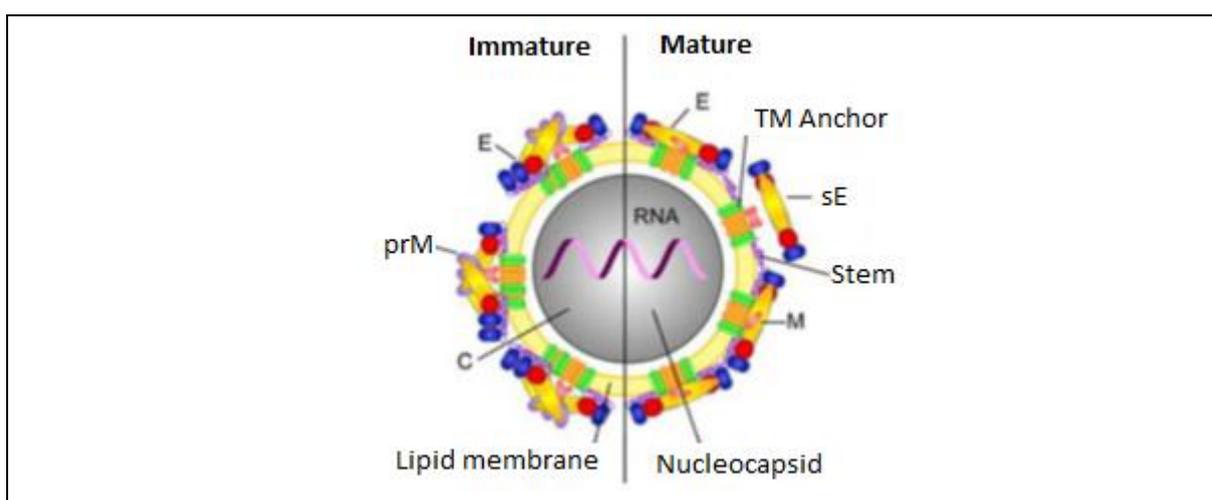
No Brasil, a vacinação é recomendada gratuitamente em crianças a partir dos nove meses de idade, para a população que mora nas áreas de risco (endêmica, transição e risco potencial) e aos viajantes que se conduzem para estas (Silva, 2008).

1.4. Características gerais do vírus da Febre Amarela

O vírus da Febre Amarela (FA) é um arbovírus pertencente à família Flaviviridae do gênero *Flavivirus*. Este vírus provoca uma infecção aguda com um grande número de sintomas clínicos, como febre, dores abdominais, dor de cabeça, calafrios, náuseas, vômito, dores no corpo, icterícia e hemorragias, com desfecho fatal em 20-50% dos casos graves. O vírus da vacina atenuada (17D) foi desenvolvido por Theiler e Smith por passagens seriadas. O material utilizado foi obtido de uma amostra sanguínea de um africano de 28 anos de nome Asibi, sobrevivente da forma benigna de FA a partir da qual proveio material viral usado para pesquisas em campo e em laboratório, além de ter dado início à cepa Asibi utilizada na produção da vacina (Neves et al., 2009).

A figura 3 apresenta o modelo esquemático da partícula viral, o qual é considerado pequeno (40-60 nm), de simetria icosaédrica, e exibe um capsídeo contornado por uma bicamada lipídica onde estão inseridas, por meio de âncoras hidrofóbicas, as proteínas do envelope (E) e a proteína de membrana (M) no vírus maduro ou pré M (prM) no vírus imaturo (Vasconcelos, 2002; Neves, 2013).

Figura 3: Modelo esquemático da partícula viral (Flavivírus). Esquerda: vírus imaturo, direita: vírus maduro.



Fonte: Neves, 2013

O nucleocapsídeo é composto por muitas cópias da proteína de capsídeo (C) que contornam uma molécula de RNA fita simples, polaridade positiva com quase 11 quilobases de comprimento, com 10.800 nucleotídeos que codificam 3.411 aminoácidos. O RNA viral expressa 7 proteínas não estruturais (NS-1, NS-2A, NS-2B, NS-3, NS-4A, NS-4B e NS-5) e três proteínas estruturais pré M, E e C (Vasconcelos, 2002; Neves, 2013).

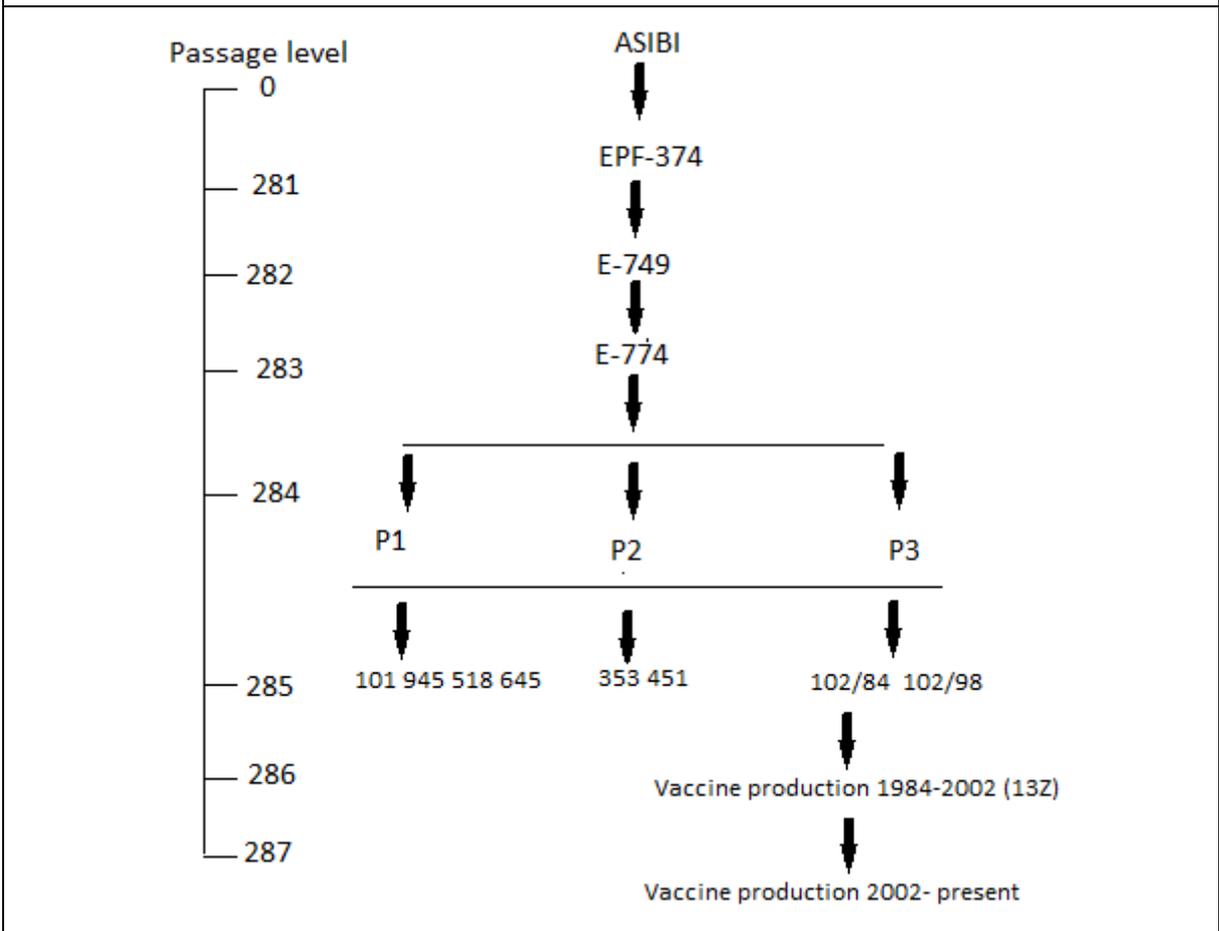
As proteínas estruturais codificam a formação da estrutura básica da partícula viral, o precursor da proteína da membrana, envelope e capsídeo, respectivamente, enquanto as proteínas não estruturais são responsáveis pelas atividades reguladoras e da expressão do vírus. O estudo do genoma do vírus da FA é importante para estabelecer as diferenças genéticas entre as cepas isoladas. Assim, estudos filogenéticos têm mostrado a existência de sete genótipos do vírus, sendo cinco na África e dois na América (Vasconcelos, 2002; Neves, 2013).

1.5. A vacina contra a Febre Amarela

A vacinação é um dos métodos mais eficientes na prevenção de doenças infecciosas. A vacina contra FA é produzida a partir da cepa atenuada 17D do vírus atenuado da FA, cultivada em ovos embrionados de galinha livres de agentes patogênicos e amplamente utilizada, com aproximadamente 20 milhões de doses distribuídas anualmente (Monath et al., 2011). Em 1937, Theiler e Smith iniciaram os estudos preliminares com a vacina atenuada em humanos desenvolvida por passagens seriadas da cepa viral Asibi em culturas de células de embriões de camundongo (18 passagens), de embriões de galinha triturados (50 passagens) e, finalmente, em culturas de embriões de galinha sem tecido nervoso (152 passagens), nomeando a cepa resultante atenuada de 17D (Neves, 2013). A definição de passagem é considerada quando realiza-se uma inoculação do vírus ao hospedeiro, atualmente são utilizados como hospedeiros embriões de galinha como meio para obtenção de uma cepa com título viral alto e de baixa reatogenicidade (reação às vacinas) (Neves, 2013). A figura 4 representa resumidamente as passagens seriadas da cepa sub-cepa viral 17DD (Neves, 2013).

Figura 4: Histórico das passagens da cepa selvagem Asibi e derivação das cepas vacinais do vírus 17D.

O lote semente EPF-374 representa a cultura na passagem 281 do vírus na passagem consecutiva em ovo de galinha. O lote semente primário P3 foi utilizado no preparo do lote semente 102/84. Este lote da vacina durou até 2002, quando o lote 993FB013Z foi derivado deste segundo lote semente, que é atualmente utilizado para a produção da vacina, estando na passagem de 287.



Fonte: (adaptada Stock e at., 2012).

Atualmente, a cepa 17D dá origem a duas sub-cepas presentemente usadas para a produção das vacinas comerciais: a 17DD, obtida na passagem 286 da 17D e utilizada para a produção da vacina no Brasil por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, e a 17D-204, obtida na passagem 204 e utilizada para a produção da vacina Stamaril® (Sanofi-Pasteur). (Neves, 2013).

A vacina proporciona, em 95% dos vacinados, imunidade efetiva contra a doença no prazo de uma semana (WHO, 2011).

A imunidade persiste por um período de 10 anos, e a regulamentação sanitária internacional exige um reforço a cada 10 anos a fim de conservar a validade do certificado de vacinação (Robertson et al., 1996).

A vacina é adquirida e disponibilizada para as áreas endêmicas e limítrofes dessas áreas através do Programa Nacional de Imunização – PNI, o qual foi iniciado em 1973, por deliberação do Ministério da Saúde, e são estabelecidos índices mínimos de coberturas vacinais. Como a meta nacional de vacinação é de 100% para a vacina contra a febre amarela, desde então o programa vem expandindo a oferta da vacina e ampliando a cobertura vacinal em todo o país (Nóbrega; Teixeira; Lanzieri, 2010).

A tabela 1, extraída do Datasus, revela que a cobertura vacinal foi ampla em todo o Brasil (Datusus, 2009).

Tabela 1: Doses aplicadas por faixa etária, doses acumuladas, cobertura vacinal e população a ser vacinada no Brasil 2000 a 2009).

DOSE: D1+R1											(1)	(2)	(3)	(4)
VACINAS APLICADAS											TOTAL VACINADO	POPULAÇÃO GERAL	COBERTURA VACINAL	A VACIN (C2-C1=
FAIXA/ANO	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2009	2009	2009	2009
< 01 Ano:	1.257.914	1.302.294	1.248.491	1.105.757	1.156.841	1.301.278	1.359.400	1.422.502	1.381.847	1.420.659	1.420.659	2.917.454	48,70%	1.496,7
01 Ano:	800.163	687.929	404.598	551.945	420.239	358.793	263.871	201.212	196.958	263.594	1.645.441	2.917.454	56,40%	1.272,0
02 Anos:	585.416	297.941	108.091	86.569	70.471	63.985	46.278	42.741	65.300	110.088	1.729.548	3.134.485	55,18%	1.404,0
03 Anos:	548.023	250.053	73.778	64.775	55.663	45.312	31.306	28.872	58.592	105.665	1.731.667	3.201.806	54,08%	1.470,1
04 Anos:	594.539	283.435	70.327	61.097	55.620	47.201	34.202	31.391	65.988	128.156	1.814.638	3.268.686	55,52%	1.454,0
05 a 09 Anos:	1.595.888	834.534	182.902	189.386	164.727	130.660	82.351	84.822	272.816	458.070	10.110.848	18.960.663	59,61%	8.849,8
10 a 14 Anos:	2.712.096	1.292.554	379.374	472.945	359.251	404.185	344.761	523.276	1.759.737	1.159.567	7.954.308	16.489.531	48,24%	8.535,2
15 a 59 Anos:	13.892.062	7.723.229	1.682.794	2.242.205	1.651.474	1.940.738	1.787.620	2.620.247	11.785.045	5.787.699	53.673.811	122.914.838	43,67%	69.241,1
60 ou + Anos:	581.607	1.041.657	294.061	449.905	374.135	417.767	307.688	404.831	1.599.715	954.404	11.423.977	19.428.086	58,80%	8.004,1
TOTAIS:											91.504.897	191.233.003	47,85%	99.728,1
											SUBTOTAL DE 01 A 04 ANOS		5.601,1	
											SUBTOTAL DE 01 A 14 ANOS		20.986,1	
											SUBTOTAL ACIMA DE 15 ANOS		77.245,1	
											TOTAL BRASIL:		99.728,1	

(1) - O total vacinado é calculado por meio de fórmula matemática aplicada na série histórica considerada;

(2) - População Censoestimativa fornecida pelo IBGE para cada faixa etária, e nascidos vivos para < 1 ano e 1 ano, no ano atual;

(3) - Percentual de cobertura vacinal em cada faixa etária, em relação ao total vacinado calculado no item(1) e a população mesclada do item(2);

(4) - Quantidade de doses a serem aplicadas (não vacinados).

Fonte: Datusus, 2009.

1.6. Imunogenicidade pós-vacinal

Uma infecção viral aguda é promovida pela ação da vacinação antiamarílica, pois o vírus é facilmente replicado e, após a administração da vacina, o sistema imune torna-se capaz de promover a replicação viral em 24 horas (Neves et al., 2009).

Após as 24 horas de replicação do vírus, pode-se observar o pico de viremia, que é a presença de vírus no sangue circulante em um ser vivo entre 3 e 7 dias da vacinação (Gaucher et al., 2008). Sabe-se que a resposta imune apresentada pelo organismo pós-vacinação não é compreendida inteiramente, porém estudos mostraram que a ação de ativação/modulação seja muito complexa e envolva padrão misto de citocinas (Silva et al., 2011).

A imunidade inata desencadeia, principalmente, à interleucina (IL)-12 em neutrófilos e monócitos e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em neutrófilos (Campi-Azevedo et al., 2012). Observa-se *up-regulation* do CD28, que é a molécula co-estimulatória mais conhecida de linfócitos T, e a CD23 dessas células, indicando, portanto, ativação do sistema (Martins et al., 2008).

A resposta imune inata é um fator importante da resposta vacinal contra a febre amarela (Neves et al., 2009). Os Estudos realizados têm comprovado o papel crucial do sistema imune inato na influência e qualidade da resposta imune adaptativa (Takeuchi e Akira, 2007; Steinman e Banchereau, 2007).

O vírus vacinal 17D e o vírus selvagem são capazes de replicar em monócitos e macrófagos humanos, incluindo células de Kupffer (Liprand e Walder, 1983; Marianneau, et al., 1999; Barros, Thomazini e Figueiredo, 2004).

O vírus 17D também é capaz de replicar, minimamente, em células dendríticas humanas sem causar morte por apoptose, porém, sendo regular para apresentação de epítopos endógenos e recombinantes às células T e o estímulo de alguns receptores *Toll-like* (responsáveis pelo reconhecimento de várias vias de padrões de reconhecimento de patógenos (PAMPs – Pathogen-associated Molecular Patterns) expressos por um amplo espectro de agentes infecciosos (Palmer et al., 2007; Barba-Spaeth et al., 2005; Querec et al., 2006; Neves et al., 2009).

Essa replicação viral também resulta na produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias IP-10 (CXCL10), interleucina (IL)-1 α , IL-1 β e TNF- α induz uma

resposta de interferon do tipo I (IFN- α/β), com maturação e ativação de células dendríticas no sangue periférico (Silva, 2011).

Recente estudo demonstrou que a interação do vírus com diferentes TLRs (*Receptor toll like*) tem sugerido o balanço de citocinas Th1 e Th2 produzido pelas células ativadas e é possível que os componentes não virais da vacina, também, possam influenciar neste equilíbrio (Querec e Pulendran, 2007; Gaucher et al., 2007).

Neves e colaboradores (2009) demonstraram a presença de células NK (*Natural Killer* – matadoras naturais) ativadas na resposta imune à vacinação antiamarílica 17DD, assim como, um aumento da expressão de TLR3 e TLR9 paralelamente a uma ativação precoce destas células, no dia 2 (embora não significativo) e significativos nos dias 4 e 7 após a vacinação (Neves et al., 2009; Campi-Azevedo et al., 2012).

Uma avaliação realizada para as citocinas intracitoplasmáticas demonstrou uma resposta imune com aspecto misto de produção de citocinas inflamatórias (IFN- α/β TNF- α e IL-12) e moduladoras (IL-5 e IL-10) por células da imunidade inata e adaptativa após a vacinação (Silva, 2005).

Santos e colaboradores (2008) também confirmaram uma resposta mista de citocinas (aumento de IFN- γ e IL-4) 15 dias após imunização (Santos et al., 2008).

Foi demonstrado que no dia 7 após a vacinação houve uma redução significativa das células NK ativadas circulantes, seguida de uma resposta compensatória no dia 15, comprovada pelo aumento de presença das células pré-NK (CD3⁻, CD16⁺ e CD56⁻) e redução das células maduras (Martins et al., 2008). Também observou-se neste mesmo tempo uma elevação de IFN- γ (Campi-Azevedo et al., 2012) e o aumento dos componentes do sistema complemento C1QA, C1QB, C3AR1 e SERPING1 (Gaucher et al., 2008).

As células NK são responsáveis por atuarem na primeira fase da resposta, restringindo a propagação do patógeno. Estas células são capazes de selecionar as DC (células dendríticas) apropriadas para exposição aos linfócitos T em compartimentos linfoides. Essas também causam a maturação das DC e produção de citocinas. Um estudo demonstrou que as células dendríticas incubadas com o vírus *in vitro* promoveram um aumento significativo de IL-1 β . Genes relacionados a macrófagos e a DC foram induzidos pela vacina, entre eles CD8, CSF1R, MARCO e IF16 (Gaucher, et al., 2008).

A indução parece estar relacionada ao desenvolvimento de memória imunitária contra o vírus amarelo (Campi-Azevedo et al., 2012). A ativação das DC mieloides e plasmocitoides via TLR2, TLR8 e TLR9, promove a produção de citocinas pró-inflamatórias potentes, incluindo IFN- α (Martins et al., 2007). Portanto, a resposta inata modula a qualidade e quantidade das células T e B (Neves et al., 2009).

O aumento da IL-10R pela maioria das células da imunidade inata ocorre em maior magnitude no 15º dia pós-vacinação. A modulação positiva (*up-regulation*) do CD16 em neutrófilos ocorre no 7º dia e CD32 em monócitos ocorrem no 7º, 15º e 30º dia. Estas ativações demonstram a presença de padrão imunomodulatório na resposta ao vírus vacinal (Martins et al., 2008).

Uma característica importante da vacina anti-amarela é a apresentação de uma resposta T mais ampla, por ser fabricada a partir de vírus vivo atenuado (Wrammert et al., 2009). Espera-se que o acionamento das células TCD8 ocorra por volta do 7º dia pós-vacinal e este fato é considerado significativo devido ao perfil de expressão de moléculas de adesão que ocorre nesse período, compondo-se de uma porcentagem reduzida de células CD8⁺ e CD62L⁺ (Martins et al., 2007). Além disso foi observado um pico de TCD8, no 15º dia após a vacinação (Wrammert et al., 2009). Além disso, foram observadas diferentes cinéticas de ativação nos linfócitos TCD4 e CD8, uma no 7º dia com um aumento da proporção de células TCD8 com marcadores de ativação inicial CD69 e de TCD4 com marcadores de ativação tardia (HLA-DR⁺), a comparar-se com o dia 0 (Martins et al., 2007).

Outras características de ativação como o aumento de CD38 e Ki67 e redução do BCL-2 também ocorrem no 15º dia. A passagem das células TCD8 efetoras para célula T de memória ocorre de forma progressiva, sendo observada por algumas semanas (Wrammert et al., 2009).

Observa-se, no 15º dia, a *up-regulation* de marcadores relacionados à resposta tipo 1 (CXCR3) e um pico da resposta TCD8, quando 4-13% dessas células expressam CD38 e HLA-DR (Martins et al., 2007). Contudo, o melhor receptor associado com a ativação das células TCD4 e TCD8 no 30º dia, é o CCR2, tipo zero (Martins et al., 2007).

As células B sofrem um processo de ativação e modulação após a primovacinação. É notada a baixa presença de células CD19⁺ circulantes no dia 7.

No entanto, no 15^o dia, é observada uma elevação das características fenotípicas de ativação e modulação. A ativação ocorre pelo aumento da porcentagem de células CD19⁺ e CD69⁺ enquanto a modulação pelo aumento da expressão de CD32 e redução das células CD19⁺ e CD23⁺ associada há diferentes falhas nas respostas imunes mediada por citocinas (Neves et al., 2009; Martins et al., 2007).

Nesse caso, a falha pode ser observada durante o perfil inflamatório da imunidade inata, notadamente de IL-12 e IFN- γ derivada de neutrófilos e monócitos. Há deficiência IL-1 e IL-2 produzidas pelas células TCD4⁺ e IL-4 produzidas por células TCD8⁺. A revacinação é capaz de ajustar a falha em pacientes inicialmente soronegativos. Já nas crianças primovacinadas, o perfil de citocina após a vacina 17D ou 17DD inclui as seguintes citocinas pela ordem: IL-10, IL-5, IFN- γ , IL-4, TNF- α , e IL-12 (Campi-Azevedo et al., 2012).

A vacina 17D leva a produção de anticorpos neutralizantes da subclasse IgM após o 7^o dia da vacinação, com pico em 2 semanas. Nas primeiras 4-6 semanas, os títulos de IgM são mais altos do que a subclasse IgG, podendo persistir por até 18 meses. Já os anticorpos IgG podem permanecer por mais de 40 anos (Pulendran, 2009).

Assim sendo, tendo como apoio o padrão de marcadores e citocinas já estudados, considera-se que a resposta imune após a primovacinação é de padrão misto, como relevante a imunidade inata e adaptativa (Campi-Azevedo et al., 2012; Martins et al., 2007).

1.6.1. Efetividade da vacina

A efetividade da vacina é avaliada segundo as interferências que a mesma promove, como os títulos mínimos de anticorpos neutralizantes que foram considerados em níveis protetores estimados a partir de estudos de dose-reposta em macacos Rhesus, expostos ao vírus ativo. Os estudos não foram realizados em humanos, pois a exposição intencional fere princípios éticos, outras inferências são: a diminuição de novos casos nos países onde há vacinação e a competência de estimular a produção de anticorpos neutralizantes (Gotuzzo et al., 2013). Em casos

de imunização passiva, os anticorpos neutralizantes, são capazes de proteger contra a doença (Monath, 2013).

Desde sua descoberta, a vacina contra a febre amarela tem oferecido proteção eficaz e segura contra a doença. A ampla cobertura vacinal comprova que a menor ocorrência da doença ocorre em regiões com o programa de imunização efetivo, sendo essa uma estratégia eficaz de prevenção. A vacina estimula uma resposta imunológica complexa que vai envolver um padrão misto/regulatório de citocinas (representado por IFN- γ , TNF- α , Células T, e células B) em indivíduos saudáveis. Para esse grupo, a resposta imune humoral, representada por anticorpos neutralizantes, é duradoura. Erros nas construções da resposta inata e/ou humoral podem gerar uma maior ocorrência de eventos adversos e/ou redução da resposta vacinal (Campi-Azevedo et al., 2012).

Testes imunológicos facilmente executáveis permitem o mapeamento rápido das áreas endêmicas e auxiliam a decidir as ações importantes para o controle da doença. Por isso, o desenvolvimento de diferentes técnicas tem sido constante. Um dos primeiros testes desenvolvidos para avaliação da proteção foi realizado em ratos (*mouse protection tests*), descrito em 1931. O teste era realizado através da inoculação de soro ou vírus na cavidade peritoneal dos animais e aqueles que sobrevivessem eram considerados imunes (Sawyer et al., 1931).

Após o aparecimento da vacina em 1937, outras técnicas para avaliar a resposta imune protetora também foram estudadas. O teste de imunofluorescência, o ELISA, o teste de inibição da hemaglutinação e o teste de neutralização por redução em placas (PRNT - *Plaque Reduction Neutralization Test*) são ensaios que podem avaliar a imunidade contra a febre amarela (Niedrig et al., 1999).

1.7. Eventos adversos associados à vacina de Febre Amarela

A vacina da FA que é administrada pela via subcutânea é considerada segura, eficaz e altamente imunogênica, mas, pode levar a eventos adversos. O quadro 1 apresenta os eventos adversos, sendo que, a queixa primária mais frequente é a dor no local de aplicação, de curta duração (primeiro e segundo dias depois da aplicação),

autolimitada e de intensidade leve ou moderada. Como reações secundárias são apontadas a inflamação, cefaleia de fraca intensidade, mialgia, dor lombar e elevação transitória de transaminases que, normalmente, ocorrem entre 2 a 11 dias da vacinação (Oliveira et al., 2013; Brasil, 2008).

Os eventos adversos mais severos registrados são a anafilaxia, que ocorre em pacientes alérgicos ao ovo ou à gelatina utilizada na fabricação da vacina, a doença neurotrópica causada por uma infecção que compromete as funções cerebrais, e a doença viscerotrópica – uma infecção que compromete o funcionamento do fígado e dos órgãos viscerais, caracterizada por uma síndrome íctero-hemorrágica (Monath et al., 2011; Klaus et al., 2010).

Quadro 1: Eventos adversos da vacina de Febre de Amarela.

EVENTO ADVERSO	DESCRIÇÃO	TEMPO APLICAÇÃO/EVENTO	FREQUÊNCIA	CONDUTA	OBSERVAÇÃO
Manifestações locais	Dor, eritema e endurecimento por 1 a 2 dias.	1-2 dias	~ 4%	Notificar abscessos, lesões extensas ou com limitação de movimentos, e casos não graves muito frequentes.	Revacinação contraindicada
Manifestações gerais	Febre, mialgia e cefaleia. Sintomas leves por 1-2 dias	A partir do 3º dia	<4% (menor em revacinados)	Notificar/investigar aglomerados de casos; não contraindicada revacinação.	Buscar casos em não vacinados
Hipersensibilidade	Urticária, sibilos, laringoespasmos, edema de lábios, hipotensão, choque.	Menos de 2 horas	2 por milhão	Ver EAPV comuns a vários imunobiológicos.	Revacinação contraindicada
Encefalite	Febre, meningismos, convulsões, torpor.	7-21 dias	1 em 22 milhões	Notificar e investigar também outras síndromes neurológicas graves; diagnóstico diferencial.	Revacinação contraindicada
Doença viscerotrópica aguda	Síndrome íctero-hemorrágica.	Primeiros 10 dias	< 1 para 450.000 doses	Notificação imediata e coleta urgente de espécimes.	Revacinação contraindicada

Fonte: Brasil, 2014.

A vacina contra a FA é altamente imunogênica, bem tolerada, segura e raríssimos são os relatos de eventos adversos graves. O Brasil dispõe de um dos mais bem-sucedidos programas de imunização e criou um sistema de vigilância de Eventos Adversos Pós-vacinação (EAPV) em âmbito nacional em 1998 (Waldman et al., 2011).

1.8. Segurança das vacinas

Nos últimos anos tem-se defendido muito a segurança dos imunobiológicos devido ao alto número de doses aplicadas de vacinas oriundas do PNI e este, talvez, seja o principal requisito de uma vacina, já que é um produto fabricado de uma fonte biológica destinada a proteger quem não está doente; logo, não se trata de reverter um quadro de doença, mas sim impedir uma ocorrência. Por isso, a perspectiva em relação à segurança das vacinas é alta por ser aplicada à pessoas saudáveis (Moura, 2009; Waldman et al., 2011).

Para garantir a segurança de uma vacina, faz-se necessário o desenvolvimento de processos de produção consistentes, robustos e reprodutíveis, testes de controle e segurança extensos e vigilância pós “marketing” (Waldman et al., 2011).

Para a promoção confiável do desenvolvimento de processo de produção e controle de qualidade, fez-se necessário a publicação de requerimentos e guias para garantir níveis de qualidade mínimos, criados pelas agências reguladoras como “Food and Drug Administration” (FDA) e “European Directorate for the Quality of Medicines” (EDQM) – Farmacopéia Européia (Ph. Eur.). Com base nestes documentos, tem-se melhorado os processos fabris e, garantido vacinas mais seguras e de altíssima qualidade (Moura, 2009).

No Brasil, com perfil parecido à FDA, foi fundada em 26 de janeiro de 1999 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), cujo desempenho regulador vem gerenciando a proteção da saúde da população através do controle sanitário e da comercialização dos produtos e serviços (Hokama, 2005).

Em 16 de abril de 2010, a ANVISA deliberou a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 17, com o objetivo de estabelecer os requisitos mínimos a serem

seguidos na fabricação de medicamentos para padronizar a verificação do cumprimento das Boas Práticas de Fabricação de medicamentos (BPF) de uso humano durante as inspeções sanitárias. Um dos requerimentos desta norma é que os fabricantes tenham um programa de garantia da qualidade (Brasil, 2010 (b)).

A garantia da qualidade tem por objetivo de implementar o Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) que está baseado em políticas, processos, manual da qualidade e documentos que se referem aos procedimentos e instruções de trabalho, os quais devem ser disseminados a todos os envolvidos de uma organização. A prática do SGQ incorporado às BPF visa diminuir, de modo significativo, os riscos inerentes a qualquer linha de produção farmacêutica garantindo assim um produto final mais seguro à população (Hokama, 2005).

1.9. Controle de qualidade da Vacina de Febre Amarela

Segundo as normas vigentes das BPF, o Controle Qualidade é responsável por garantir que os procedimentos referentes à amostragem, especificações, ensaios, procedimentos de organização, documentação e procedimentos de liberação que asseguram que os ensaios necessários e relevantes sejam executados e que os materiais não sejam liberados para uso, nem os produtos liberados para venda ou fornecimento, até que a qualidade dos mesmos seja julgada satisfatória. O controle de qualidade não deve limitar-se às operações laboratoriais, também deve estar envolvido em todas as decisões relacionadas à qualidade do produto (Roca et al., 2007).

Portanto, resumidamente, o Controle de Qualidade (CQ) é um conjunto sistemático de análises destinadas a avaliar, se um produto cumpre com as especificações estabelecidas, visando comprovar a qualidade do produto fabricado do início ao final do processo (Hokama, 2005).

O conjunto sistemático de medidas para garantir a qualidade de um medicamento foi, ao longo dos anos, avançando nos setores da esfera pública responsáveis pela produção e comercialização de vacinas, o qual foi marcado por um fato histórico que ocorreu em 1981, quando foi verificada que a vacina importada da

Iugoslávia que seria utilizada na campanha contra a poliomielite apresentava uma não conformidade pela alteração de cor e presença de impurezas em alguns frascos. Devido a este problema, foram adiados os dias nacionais de vacinação, previstos para julho e agosto daquele ano e desde então tem-se melhorado os controles de processo realizados durante a produção, assim como os testes em laboratório para a liberação das vacinas (Ponte, 2003).

Atualmente, para garantir a qualidade da vacina de febre amarela (atenuada) de Bio-Manguinhos, são realizados testes importantes desde a produção até o produto terminado, isto é, aquele que será administrado na população. As etapas de avaliação da qualidade do produto que está sendo produzido ocorrem após os preparos da suspensão viral estabilizada, produto a granel e produto terminado, conforme representadas na tabela 2 (Reisdörfer, 2011).

Tabela 2: Testes realizados na vacina de Febre Amarela.

Fases da Vacina	Testes realizados
Suspensão viral estabilizada	Esterilidade, potência, micobactéria, leucose aviária, agentes adventícios, micoplasma.
Produto a granel	Esterilidade, potência e micoplasma.
Produto terminado	Aspecto, potência, termoestabilidade, umidade residual, identidade, esterilidade, endotoxinas bacterianas, ovoalbumina residual e nitrogênio proteico.

Fonte: adaptado de Reisdörfer, 2011.

A suspensão viral estabilizada é um composto de embriões de galinha triturados e centrifugados com estabilizadores; já para produção do produto a granel, na suspensão viral estabilizada são adicionados outros estabilizadores e antibióticos. Finalmente, ocorre o envase do produto e posterior liofilização, dando origem ao produto terminado. Após a aprovação pelo controle de qualidade, os frascos são rotulados e embalados (Reisdörfer, 2011).

Desde 1983 o Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde (INCQS) vem certificando as vacinas utilizadas no PNI com teste de avaliação da qualidade do

produto final e isto tem garantido à população o fornecimento de vacinas seguras devido ao rigoroso controle de qualidade (Ponte, 2003).

As especificações adotadas para a liberação do produto terminado da vacina febre amarela (atenuada) estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Especificações da vacina de febre amarela Bio-Manguinhos.

Teste	Especificação
Aspecto	Forma liofilizada que após a reconstituição pode apresentar coloração.
Potência	1000 DL ₅₀ equivalente a 3,73 UFP/dose ou 3,00 UI/dose.
Termoestabilidade	Após permanecer por 14 dias armazenada a 37 °C, a vacina deve estar com o título de 1000 DL ₅₀ equivalente a 3,73 UFP/dose ou 3,00 UI/dose e não menos que 1log 10 em relação ao título da potência.
Umidade residual	< 3%
Identidade	Positivo.
Esterilidade	Ausência de crescimento bacteriano e fúngico.
Endotoxina bacteriana	< 10 UE/mL
Ovoalbumina residual	≤ 5 µg/dose
Nitrogênio proteico	≤ 5 mg/dose

Fonte: adaptado de Reisdörfer, 2011.

1.10. Ensaio para detecção viral e avaliação da imunogenicidade

1.10.1. Isolamento e quantificação do vírus da Febre Amarela

Para o isolamento e quantificação do vírus da Febre Amarela tem sido utilizada na rotina dos laboratórios, a união de técnicas que permitam o diagnóstico preciso da

doença, o uso paralelo de mais de uma técnica favorece tanto o paciente quanto o analisador um diagnóstico confiável (Brasil, 2008).

Para um diagnóstico específico da Febre Amarela é recomendado que as amostras de sangue ou soro sejam coletadas nos primeiros cinco dias após o início da febre e o isolamento é realizado por técnicas de inoculação do material em culturas celulares e por técnicas de detecção de antígenos virais e/ou ácido nucléico viral por reação em cadeia da polimerase antecedida por transcrição reversa do RNA viral (RT-PCR) – um método mais rápido (Benchimol, 2001; Figueiredo, 2006).

Nas técnicas de isolamento podem ser detectados antígenos ou ácido nucleico viral no sangue humano, de macacos e mosquitos, mediante os seguintes métodos:

- **Imunofluorescência:** é uma técnica que permite a visualização de antígenos nos tecidos ou em suspensões celulares utilizando corantes fluorescentes, que absorvem luz e a emitem num determinado comprimento de onda. Pode ser feita após o isolamento viral, pelo método direto ou indireto (Brasil, 2008).
- **Imuno-histoquímica:** a amostra do tecido utilizado para o diagnóstico histopatológico pode ser também utilizada para a detecção do vírus nos ensaios de imuno-histoquímico. Para isso, os tecidos são fixados em formalina, utilizando anticorpo marcado com uma enzima (fostafase alcalina ou peroxidase) (Santana et al., 2014).
- **Hibridização *in situ*:** é uma técnica pela qual se identificam sequências específicas de nucleotídeos em células ou cortes histológicos. Estas podem ser de DNA ou RNA, endógenas, bacterianas ou virais. A detecção dos genomas virais específicos faz-se pelo uso de sondas radioativas (radioisótopos) ou não radioativas (enzimas), inclusive em materiais conservados por muitos anos (Brasil, 2008).
- **Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR):** é uma técnica utilizada para a detecção de quantidades mínimas de ácido nucleico viral presente nas amostras, realizado pela amplificação do c-DNA obtido a partir do RNA viral empregando sondas (*primers*) adequadas para amplificar sequências específicas do vírus da febre amarela. O bom desempenho desse método depende em parte da

preservação do espécime clínico, sendo recomendado mantê-los em baixa temperatura (Brasil, 2008).

1.10.2. Ensaios sorológicos para avaliação da imunogenicidade

Os testes sorológicos são realizados em indivíduos que estejam com 5 dias de infecção. São eles: testes de reação imunoenzimática de captura de IgM (MAC-ELISA), de inibição da hemaglutinação (IH), teste de neutralização (N) e o de fixação de complemento (FC). Dentre eles, o mais empregado devido à sua praticidade e seu baixo custo são os que se baseiam na interação de alguns antígenos virais com anticorpos específicos (Araujo et al., 2002).

O ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – ensaio imunoenzimático) para IgM é específico em casos de infecção primária, pois oferece um diagnóstico presuntivo rápido. Porém reações cruzadas podem ocorrer ao longo do tempo e em casos de exposição prévia a outros flavivírus; por isso, torna-se importante conhecer a história clínica e epidemiológica do paciente (Simões, 2011; Vasconcelos, 2002).

O princípio dos ensaios imunoenzimáticos consiste na detecção de anticorpos específicos no soro ou plasma sanguíneo, que é realizada pela reação antígeno-anticorpo, onde uma das duas moléculas é conjugada com uma enzima como, por exemplo, a peroxidase. Utiliza-se também uma substância cromogênica e um substrato específico para a enzima. Uma resposta positiva para o teste indica a presença de cor, significando que houve reação de um antígeno ao anticorpo. Este ensaio permite uma análise quantitativa do resultado (Stephens et al, 2009).

No teste IH, o vírus da FA tem a característica de hemaglutinação; então, hemácias de aves são misturadas ao soro do paciente, pois é reconhecida a capacidade de bloqueio do vírus pela sua ligação com o anticorpo específico.

Assim, se o soro testado contiver os anticorpos já haverá a formação do complexo antígeno-anticorpo e, desta forma, não ocorrerá a hemaglutinação, confirmando a presença dos anticorpos específicos. Equivalentemente, a ausência de anticorpos contra o vírus permitirá a hemaglutinação. Uma limitação para o uso do

teste é a inespecificidade, pois ele não faz distinção entre IgG e IgM, sendo caracterizado como um teste pouco específico (Simões, 2011).

A técnica de neutralização com anticorpos baseia-se na aplicação de vírus em cultura de células como, por exemplo, as células VERO e bloqueio da replicação viral por anticorpos neutralizantes vindos do soro do paciente. Este método avalia a competência dos anticorpos presentes nas amostras de soro do paciente em neutralizar os vírus, ou seja, diminuir ou eliminar o efeito citopático, que corresponde ao dano que o vírus causa a célula infectada (Stephens et al., 2009).

O PRNT - *Plaque Reduction Neutralization Test* – teste de neutralização por redução de placa de lise), é um ensaio de diagnóstico sorológico, sendo considerado mais sensível e mais específico em amostras de soro convalescente. É utilizado para quantificar a concentração de anticorpos neutralizantes IgG e IgM (Simões et al., 2012; Maeda & Maeda, 2013).

O PRNT, inicialmente descrito em 1969, é considerado o padrão ouro (Niedrig et al., 1999) para aferição da habilidade do soro em neutralizar o vírus amarelo. A técnica utiliza cultura de células em monocamada e a atividade neutralizante é determinada a partir de diluições seriadas do vírus 17D (Jonker; Visser; Roukens, 2013).

Embora o PRNT seja o método padrão ouro para determinação de anticorpos neutralizantes, existem diferenças metodológicas entre os laboratórios que podem gerar um problema na reprodutibilidade do método. Por isso, há necessidade do uso de controles positivos e negativos para melhor controle de qualidade, justificando a padronização do uso de unidades internacionais como unidade de medida (Niedrig et al., 1999; Grobusch et al., 2013).

Esta técnica apresenta algumas particularidades que precisam ser consideradas, tais como alto custo analítico devido ao tempo que leva para emissão de um resultado, pessoal eficientemente treinado, equipamentos e insumos específicos e não sendo, portanto, facilmente passível de produção elevada, tornando difícil a sua utilização em grande escala (Simões, 2011; Maeda & Maeda, 2013).

O teste de FC pode ser usado para determinar a presença ou quantificar antígenos ou anticorpos, quando um dos elementos é conhecido (Seadi, 1998).

A detecção da presença, isto é, reação qualitativa, ocorre quando temos uma reação antígeno/anticorpo e subsequentemente a fixação do complemento. Assim,

uma amostra sorológica que não contém anticorpos específicos para o antígeno em questão não fixa o complemento. E quando ocorre a investigação de um antígeno com um soro conhecido, e este não está presente na amostra testada igualmente, não fixará o complemento (Seadi, 1998).

As reações de quantificação adotam o mesmo princípio da reação qualitativa, somente são realizadas diluições seriadas do soro em teste e são adicionadas quantidades fixas de antígeno (Seadi, 1998).

O quadro 2 apresenta resumidamente as vantagens e desvantagens dos ensaios sorológicos de maneira geral (Maeda & Maeda, 2013).

A peculiaridade de cada teste foi evidenciada pelos estudos de validação das técnicas, o qual tem como objetivo a confirmação por ensaio e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (Brasil, 2003; Brasil, 2012).

Quadro 2: Propriedades de alguns flavivírus utilizados frequentemente nos protocolos de sorodiagnóstico.

Sorodiagnóstico	Anticorpo detectado	Vantagens	Aplicação	Desvantagens
MAC-ELISA	IgM	Facilidade de utilização. Remoção não específica de anticorpos de ligação (lavagens).	Aparecimento de uma infecção aguda ou recente.	Diferentes resultados obtidos entre uma infecção primária e uma secundária. Persistência da resposta de IgM por anos.
IH	IgG, IgM	Nenhuma exigência para quaisquer anticorpos. Nenhuma especificidade de espécies. Nenhuma exigência para equipamento caros.	Diferenciação entre grupos, complexos, e tipo específico de determinantes. Aplicação em qualquer amostra de soro. Fiscalização.	Alta reação cruzada.
PRNT	IgG, IgM	Elevada especificidade (mais específica).	Determinação de anticorpos específicos. Diferenciação de infecção por vírus.	Necessário longo tempo para emissão do resultado. Exigência de cultura de células.

FC	IgM	Elevada especificidade	Aparecimento de uma infecção aguda ou recente.	Reação trabalhosa, titulação do antígeno, hemolisina (anti-hemácia de carneiro) e do complemento.
----	-----	------------------------	--	---

Fonte: Adaptado de Maeda & Maeda, 2013.

1.11. Desenvolvimento de métodos alternativos (passado, futuro e avanços)

Tradicionalmente, o uso de animais no desenvolvimento de uma pesquisa é uma prática bastante comum, têm um papel importante no controle de qualidade dos lotes de vacinas, e, logo, a utilização de animais para estes propósitos é enorme. Foi realizada uma previsão na Europa de que cerca de 10% do número total de animais de laboratório utilizados são requeridos para os testes de segurança e potência de vacinas para aplicação veterinária e humana, entretanto este procedimento tem sido motivo de vários questionamentos, especialmente de caráter ético, em virtude do alto número de animais utilizados e do sofrimento durante os experimentos (Hendriksen et al., 1998).

Por esse motivo, tem-se avaliado a utilização de animais e isso tem gerado um movimento mundial, solidificado a partir da iniciativa de diversas instituições que avaliam o desenvolvimento, a validação de novos métodos alternativos e a implementação regulatória de testes alternativos, a fim de certificar e harmonizar o uso dos mesmos em diversos países. (Cazarin et al., 2004).

Um exemplo é a utilização de células VERO para o uso no desenvolvimento de vacinas e procedimentos analíticos que, são oriundas de linhagens de células isoladas do rim de um macaco verde africano (*Chlorocebus* sp.) anteriormente chamados *Cercopithe cusaethiops*.

A linhagem foi desenvolvida em 1962, por Yasumura e Kawakita na Universidade de Chiba em Chiba, Japão (Alves e Guimarães, 2010).

Futuramente, a previsão é a redução do número total de animais e isto seria promovido por algumas razões, nomeadamente:

- a) o estabelecimento de um novo conceito de controle de qualidade das vacinas;
- b) a atenção que está sendo gerada ao desenvolvimento e implementação de métodos alternativos; e
- c) a pesquisa e o desenvolvimento de novas gerações de vacinas (Hendriksen, et al., 1998).

Paralelamente a estas mudanças, já foi fundamentado o programa internacionalmente reconhecido chamado de 3Rs (*Reduction, Refinement, Replacement*), que visa a redução do número de animais em pesquisas, a dor, o desconforto dos mesmos, e a busca de alternativas aos experimentos *in vivo*. O programa 3Rs foi iniciado em 1954, num projeto realizado pela Federação das Universidades para o Bem-estar Animal (*The Universities Federation for Animal Welfare – UFAWs*), que derivou na publicação dos Princípios das Técnicas Experimentais Humanas (*The Principles of Humane Experimental Techniques*) em 1959, por William Russell e Rex Burch, que foram os mentores desta filosofia. Entretanto, o fortalecimento desta filosofia só foi alcançado em 2000, quando foi anunciada oficialmente os planos de extinguir o teste de DL 50 (*Test Guideline 401*) de seus protocolos, em favor dos 3Rs (Cazarin et al., 2004).

É importante destacar que métodos alternativos *in vitro* validados, genuínos e aceitos com propósito regulatório, ainda são vistos como uma meta e não como um fato concreto, apesar das opiniões vastamente incorporadas por cientistas, por organizações não governamentais e por algumas agências regulamentadoras. Atualmente, os métodos alternativos são considerados um avanço e uma oportunidade de aquisição de benefícios científicos, econômicos e humanitários (Cazarin et al., 2004).

1.12. Conceitos básicos na validação de um teste bioanalítico

A validação de métodos é primordial para o Sistema da Garantia da Qualidade. A RDC Nº 27, de 17/05/2012 (ANVISA), foi escrita para estabelecer os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos para

registro e pós-registro de medicamentos no Brasil, sendo utilizada como referência, a qual objetiva o fornecimento de evidência, de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos, isto é, a validação permite demonstrar que o método é adequado para o uso, avaliando o método, a determinação das características e verificação de que os requisitos podem ser atendidos (Brasil, 2003; Barros, 2002).

A validação de um método não é apenas justificada pela demonstração da confiabilidade dos resultados obtidos, mas também pela importância e necessidade de implementação dos sistemas da qualidade para atendimentos aos requisitos técnicos, legais e comerciais, apesar da existência de poucas normas e diretrizes oficiais na harmonização durante a execução dos procedimentos de validação (Possas, 2014).

Um teste bioanalítico é aquele em que o tipo de amostra a ser analisada é oriundo de amostras biológicas, devido a diversos fatores analíticos e biológicos, e tipicamente apresenta uma maior variabilidade do que os testes químicos (Possas, 2014).

Métodos normalizados, como os compendiais, são métodos validados, isto é, são ensaios satisfatoriamente avaliados e aprovados, portanto não sendo preciso realizar o procedimento completo de validação desde que alterações importantes que possam comprometer o desempenho do ensaio não sejam inseridas no método. Entretanto, a consonância do método normalizado deve ser verificada sob condições reais de uso (Brasil, 2003).

A validação de um novo método, ou seja, de um ensaio desenvolvido internamente pelo laboratório deve ser efetuada após seleção, desenvolvimento e otimização do método (Barros, 2002).

A RDC nº 27/2012 estabelece os ensaios que devem ser avaliados para garantir a efetividade dos métodos bioanalíticos: precisão, exatidão, curva de calibração, efeito residual, efeito matriz, seletividade e estabilidade. Porém, a aplicação desses parâmetros deve ser pertinente ao método, sendo necessário analisar o impacto e a criticidade que possa afetar a confiabilidade da metodologia (Brasil, 2012).

Os conceitos definidos na RDC nº 27/2012 são:

1- Curva de calibração: relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. A curva de calibração define as amostras:

- Amostra de controle de qualidade (amostra de CQ): amostra de matriz adicionada do analito em concentração específica, usada para validar e monitorar o desempenho de um método bioanalítico.
- Amostra de controle de qualidade de alta concentração (amostra de CQA): amostra de matriz adicionada do analito em concentração entre 75 e 85% da maior concentração da curva de calibração.
- Amostra de controle de qualidade de baixa concentração (amostra de CQB): amostra de matriz adicionada do analito em concentração até três vezes o limite inferior de quantificação do método (LIQ).
- Amostra de controle de qualidade de diluição (amostra de CQD): amostra de matriz adicionada do analito em concentração acima da maior concentração da curva de calibração (LSQ).
- Amostra de controle de qualidade de média concentração (amostra de CQM): amostra de matriz adicionada do analito em concentração próxima à média entre os limites inferior e superior de quantificação.
- Limite inferior de quantificação (LIQ): menor concentração do analito na curva de calibração preparada na matriz.

2- Seletividade: capacidade do método de diferenciar e quantificar o analito e padrão interno (PI) na presença de outros componentes da amostra.

3- Precisão: proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz.

4- Exatidão: concordância entre o resultado de um ensaio e um valor de referência.

A Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (Brasil, 2003), definiu os limites de detecção e de quantificação, que são:

1-Limite de detecção: é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

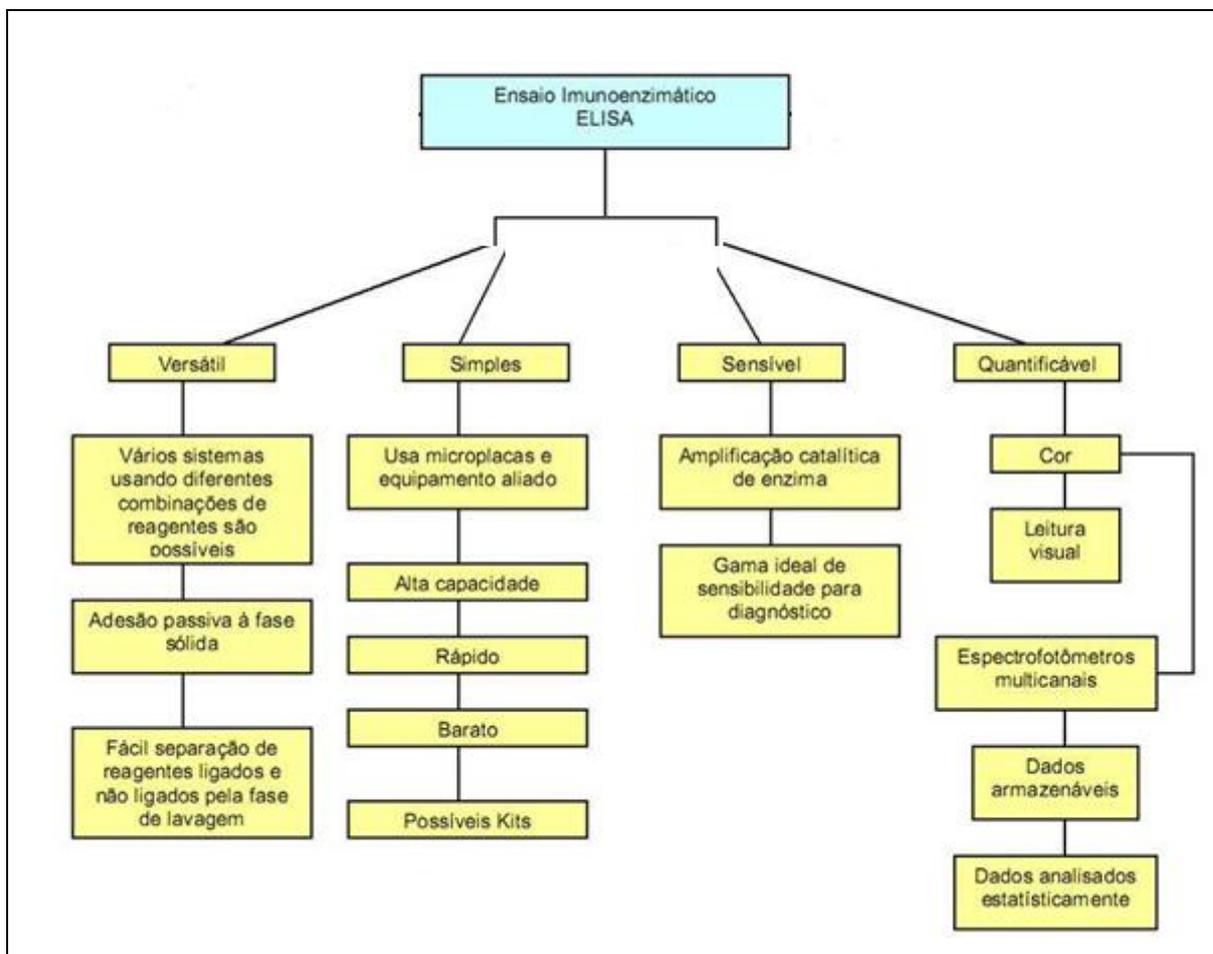
2- Limite de quantificação: é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (Brasil, 2003).

2. JUSTIFICATIVA

O PRNT é um teste padrão empregado na avaliação da eficácia vacinal e apresenta frente a outros testes de sorologia, maior especificidade na detecção e quantificação de anticorpos neutralizantes. No entanto, o PRNT demanda tempo para a obtenção de um resultado e pode também apresentar variabilidade se as etapas do processo não estiverem bem estabelecidas e com critérios de aceitação definidos, já que a sua execução demanda certos cuidados, tais como: manutenção de cultura celular, equipamentos e insumos específicos e analistas bem treinados e experientes (devido à forma de leitura visual do resultado) e pelas longas etapas do procedimento – estima-se um mínimo 14 dias. Por isso, considera-se difícil sua execução em grande escala. O método alternativo foi desenvolvido através da técnica de ELISA, que apresenta inúmeras vantagens conforme exposto na figura 5.

Face ao exposto, torna-se relevante o desenvolvimento e validação do método ViBI (*Virus Binding Inhibition*), que tem como aplicação a inibição do vírus da febre amarela por anticorpos IgG presentes em soros, quantificando pelo clássico teste imunoenzimático. Este método foi desenvolvido tendo como base o princípio do teste de inibição de ligação da toxina diftérica/tetânica (ToBI) por Matos e colaboradores, (2002). O teste tem como vantagens o aumento da efetividade na avaliação da imunogenicidade da vacina de Febre Amarela, considerando-se o tempo necessário para a obtenção de resposta sobre a imunização, além de poder emitir um resultado rápido, de baixo custo e automatizado em equipamento qualificado.

Figura 5: Vantagens da utilização do ELISA.



Fonte: Adaptado de Possas, 2014.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente estudo visa desenvolver e validar um ensaio imunoenzimático alternativo para quantificação de anticorpos IgG contra o vírus febre amarela presente no soro de um grupo de indivíduos brasileiros imunizados com a vacina 17DD produzida em Bio-Manguinhos.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar os limites de concentração de soros através de 4 curvas, para estabelecer critérios para seleção de resultados positivos e negativos (ponto de corte);
- Titular pelo método ViBI, 30 soros amostrais de indivíduos imunizados com a vacina 17DD, para avaliar a efetividade da escolha do ponto de corte;
- Avaliar os títulos de anticorpos contra o vírus da FA obtidos pelo método alternativo imunoenzimático (ViBI – *Virus Binding Inhibition*) frente aos resultados obtidos pelo (PRNT) em amostras de soro humano pelas ferramentas estatísticas de Spearman, Mann Whitney e Wilcoxon;
- Realizar a avaliação da validade/acurácia do método ViBI;
- Estabelecer curva de calibração utilizando a faixa de 20000, 15000, 10000, 5000, 2500, 1250, 625, 312,5 156,25, 78,125, 39,06, 19,53 mUI/mL para determinar as amostras de CQ;
- Determinar a seletividade do método, de acordo com a RDC nº 27/2012, frente a amostras de soro positivo para outros flavivírus;
- Determinar a precisão intra e intercorrida e a exatidão do método a partir de repetições independentes para cada soro;
- Determinar os limites de detecção e quantificação do método.

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais e métodos

Os experimentos foram realizados segundo o Documento Interno (DI), estabelecido no Laboratório de Tecnologia Imunológica (LATIM) pertencente à Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos de Bio-Manguinhos (nº 7279) (Bio-Manguinhos, 2013, nº 7279) e o Protocolo de validação estabelecido na Seção de Validação Analítica (nº 7712) (Bio-Manguinhos, 2013, nº 7712) pertencente à Vice-Diretoria de Qualidade (VQUAL) do mesmo Instituto.

Os parâmetros de validação e amostras (soros na concentração LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD) foram determinados conforme as diretrizes da Resolução - RDC Nº 27, de 17/05/2012 da ANVISA (Brasil, 2012).

Os equipamentos, instrumentos e instalações foram qualificados, calibrados e certificados, portanto, aprovados para o uso em laboratório, de acordo com as normas de qualidade do Laboratório de Metrologia e Validação (LAMEV) do Departamento de Garantia de Qualidade de Bio-Manguinhos.

4.1.1. Soros amostrais

Foram utilizados 39 soros de adultos não vacinados e vacinados que participaram de um estudo de dose-resposta da vacina contra FA produzida em Bio-Manguinhos. Os soros foram previamente inativados a 56 °C em banho-maria por 30 minutos e mantidos a - 20 °C até a realização dos testes. Para a validação do método foram utilizados 3 soros amostrais.

As amostras de soros foram oriundas de dois estudos clínicos aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas nº 0038.0.009.000-08 e da Fundação Oswaldo Cruz, nº 145/01.

4.1.2. Soro padrão *In House*

O soro padrão preparado *in house* utilizado como controle positivo (M7/100) foi obtido de macacos Rhesus (*Macaca mulata*), vacinados contra FA, com título de anticorpos neutralizantes contra o vírus de 1115 mUI/mL e calibrado frente a um soro de referência internacional da OMS com título de anticorpos de 14300 mUI/mL (Copenhagen Serum Institute) (Freire et al., 2005). O soro padrão foi inativado e estocado a -20 °C até a realização dos testes. O soro padrão *in house* foi cedido pelo Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV-Bio-Manguinhos).

4.1.3. Anticorpo monoclonal 2D12

O anticorpo monoclonal obtido do fluido ascítico utilizado neste trabalho foi produzido e fornecido pelo Laboratório de Anticorpos Monoclonais (LATAM) de Bio-Manguinhos.

Este fluido contém o anticorpo monoclonal 2D12 específico para a proteína E do envelope do vírus da FA cepa 17D conforme Schlesinger, Brandriss e Monath (1983) e Monath e Nystrom, 1984a,1984b.

Originalmente, o fluido ascítico utilizado no LATAM foi proveniente da ATCC (CRL-1689TM), designado 2D12, isotipo IgG2a, de cadeia leve kappa, originário de células B de camundongo [*Mus musculus* (mieloma)], tipo celular linfócito B (Schlesinger; Brandriss; Monath, 1983).

4.1.4. Anticorpo 2D12 conjugado com HRP

O anticorpo 2D12 conjugado com HRP utilizado neste trabalho foi produzido e fornecido pelo Laboratório Tecnologia Diagnóstica (LATED) de Bio-Manguinhos.

A conjugação do anticorpo monoclonal 2D12 com a enzima peroxidase (HRP Sigma, 25.000 unidades, Tipo VI) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Nakane e Kawaoi (1974) e por Camargo e colaboradores (1987). Foram dissolvidos 4 mg de peroxidase em 1 mL de água e, em seguida, adicionado 0,2 mL de metaperiodato de potássio (0,1 M) em agitação constante, por 20 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a solução contendo peroxidase e metaperiodato de potássio foi filtrada em coluna Sephadex G-25 (PD10) (Amersham Pharmacia Biotech), equilibrada com solução de acetato de sódio (1 mM, pH 4,4). Após desprezar o volume de 3,5 mL (volume de leito da coluna), coletou-se uma fração de 1,5 mL e, posteriormente, o pH da mistura (peroxidase/meta-periodato) foi ajustado para pH 9,5 utilizando-se o tampão carbonato/bicarbonato (0,2 M, pH 9,5).

O anticorpo monoclonal 2D12 purificado contendo uma concentração de 8 mg/mL foi eluído em coluna Sephadex G25, equilibrada com tampão carbonato/bicarbonato (0,01 M, pH 9,5). A conjugação da peroxidase (1,5 mL) com a IgG (1,5 mL) foi realizada sob agitação constante por 2 horas. Após, foi adicionado lentamente 0,1 mL da solução de boroidreto de sódio (0,1 M) e manteve-se este conjugado por mais 2 horas a 4 °C.

Após este procedimento, o conjugado foi dialisado em uma coluna de Sephadex G-25 (PD10) equilibrada com tampão fosfato salina (Na_2HPO_4 10 mM, NaCl 0,15 mM, pH 7,2). Novamente, 3,5 mL de volume de leito da coluna foram desprezados e 3,0 mL do conjugado coletados. O conjugado foi estocado em freezer a -20°C em uma solução de PBS/glicerol (v/v) em uma diluição 1:10.

4.1.5. Vírus 17DD (FA)

O vírus 17DD utilizado neste trabalho foi preparado e fornecido pelo Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV) de Bio-Manguinhos. A produção do vírus da febre amarela 17DD foi realizada a partir da vacina lote 035VFA035P, Fiocruz, Brasil, o qual foi produzido através do cultivo em células Vero (rim de macaco verde africano) no biorreator Bioflo modelo 110 (New Brunswick Scientific, EUA), operado em batelada

usando um meio livre de soro VP-SFM (Gibco, EUA), e 3 g/L de microcarreadores Cytodex (GE Healthcare, EUA).

A clarificação do vírus e purificação foi realizada por filtração através de uma série de membranas de celulose/acetato de 8 µm, 3-0,8 µm e 0,45-0,22 µm de porosidade (Sartorius, EUA). Para purificar o vírus foi realizada cromatografia de troca iônica (Äkta purificador, Amersham Bioscience), obtendo-se um lote purificado chamado VINFLAP001/2010.

O vírus inativado foi previamente filtrado através de membrana de 0,22 µm e o pH foi ajustado para 8,5 utilizando NaOH 1 N. A propiolactona foi utilizada como agente de inativação em diluição de 1:3000 (Natalex, 97% de pureza), sendo adicionada à suspensão, seguida por incubação de 4 °C sob agitação constante de 100 rpm durante 24 horas. Após, a suspensão foi hidrolisada com propiolactona e mantida a 37 °C durante 2 horas. O processo de inativação resultou na amostra do lote, VINFLAPI001/2010 purificada e inativada.

4.2. Desenvolvimento do Teste de Inibição da ligação do Vírus (ViBI)

4.2.1. Procedimento para o teste de quantificação de anticorpos IgG anti Febre Amarela

Previamente, ao estabelecimento do ViBI a equipe do LATIM desenvolveu e validou um ELISA para quantificar o vírus da FA inativado, sendo este processo fundamental e facilitador para o desenvolvimento de um teste de quantificação de anticorpos contra FA. O teste foi nomeado de ViBI, pelo princípio de inibição da ligação do vírus de FA quando este é reconhecido por anticorpos IgG contra FA (Matos et al., 2002).

Foi realizada a sensibilização de uma placa de poliestireno de 96 poços de fundo chato com 100 µL de anticorpo monoclonal 2D12 a 1 µg/mL em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6.

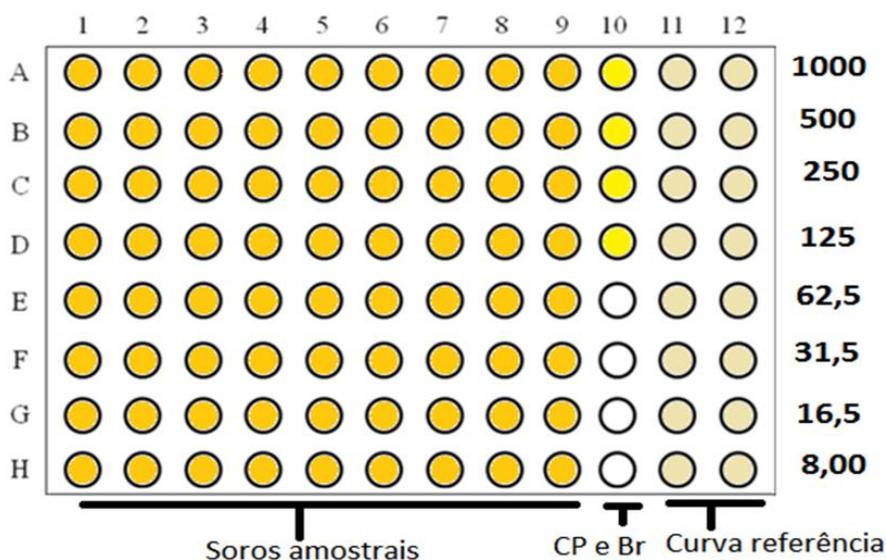
A placa, foi incubada por no mínimo 12 horas a 4 °C, foi lavada manualmente 5 vezes com 300 µL de solução de lavagem (PBS pH 7,4 e tween 20 a 0,05%), após, foi bloqueada com 100 µL/orifício de solução de bloqueio/diluyente, (PBS pH 7,4, lecitina do leite a 5%, SFB a 3% e BSA a 0,05%.)

A placa foi incubada em estufa por 1 hora a 37 °C e posteriormente lavada manualmente 5 vezes com a solução de lavagem e então foram adicionados 50 µL da solução de bloqueio/diluyente em todos os poços e mais 50 µL na 10ª coluna, que foi considerado o controle negativo (branco), e 45 µL nos poços da linha 1A até 9A, onde foram adicionadas as amostras a testar.

Foram colocados 5 µL das amostras a testar (diluição final 1:10) nos poços 1A até 9A, e 50 µL da referência *in house* a 2 UI/mL nos poços A11 e A12. Uma diluição seriada com pipeta multicanal (50 µL) da linha A até a linha H foi realizada, produzindo uma curva de referência com as concentrações: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,5; 16,5 8,00 mUI/mL. Na figura 6 está representado o esquema de distribuição dos insumos na placa.

Figura 6: Esquema de distribuição dos insumos na placa de fundo chato.

Esquema ilustrativo da placa de 96 poços para a realização do ViBI. As colunas 1 a 9 foram destinadas aos soros amostrais, na coluna 10, o controle positivo (vírus 100%) e ao branco e as colunas 11 e 12 as curvas de referência (M7/100). Estes soros foram submetidos às diluições seriadas (fator 2).



Fonte: Desenvolvimento Bio-Manguinhos.

O vírus FA 17DD foi diluído a 20 µg/mL em solução de bloqueio/diluyente e foram adicionados 50 µL em cada poço da placa menos nos poços do branco.

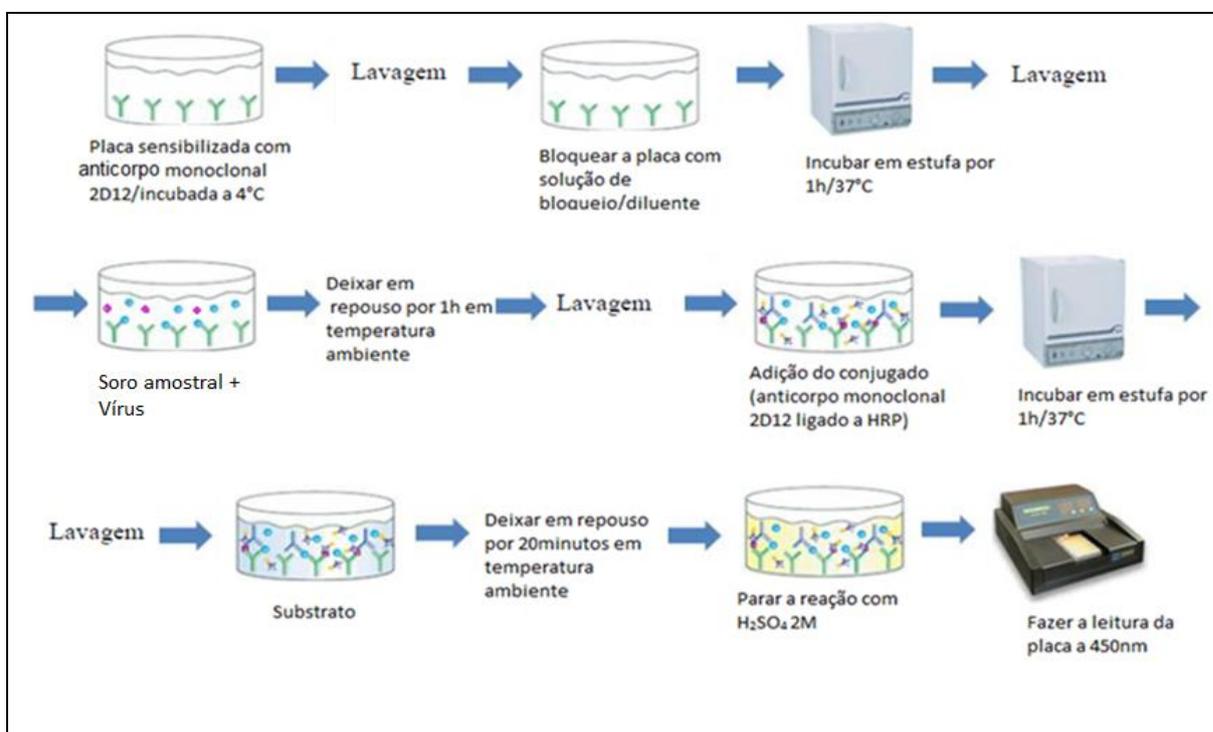
A placa foi incubada por 1 h a temperatura ambiente. Após, a placa foi lavada manualmente 5 vezes com a solução de lavagem. Foram adicionados na placa 100 µL do conjugado diluído a 1:800 (previamente titulado) em solução bloqueio/diluyente.

A placa foi incubada por 1 h a 37 °C e, após, a mesma foi lavada manualmente 5 vezes com a solução de lavagem.

Em todos os poços da placa foram adicionados 100 µL do substrato, (acetato de sódio 0,11 M pH 5,5, TMB 6 mg/mL e H₂O₂ a 10%). Após, a placa foi incubada a temperatura ambiente por 20 minutos, sob a proteção da luz. A reação foi parada pela adição de 100 µL em todos os poços de uma solução de H₂SO₄ a 2 M.

Para a leitura da densidade óptica, foi utilizado o leitor de ELISA do fabricante TECAN®, no comprimento de onda de 450 nm. A análise teve em média a duração de 24 horas. Na figura 7 está apresentado o esquema do procedimento de dosagem de anticorpos IgG.

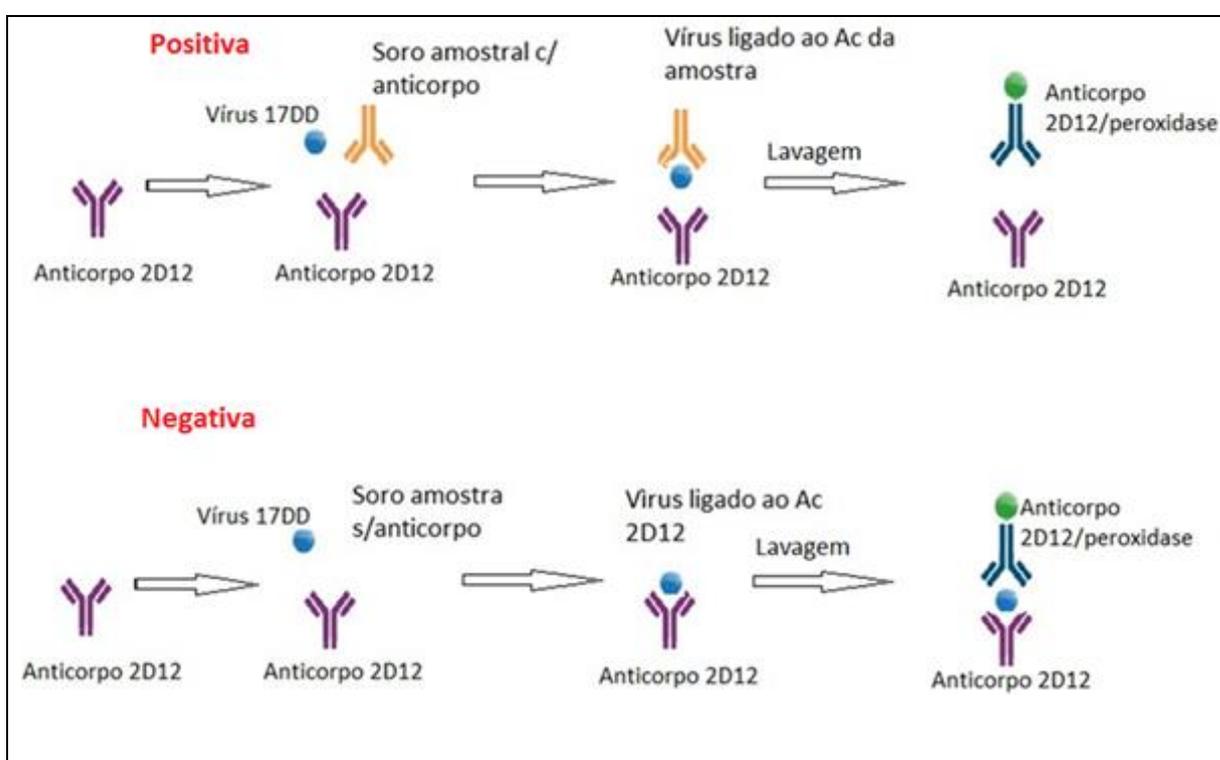
Figura 7: Esquema para o procedimento de dosagem de anticorpos IgG contra FA.



Fonte: Desenvolvimento Bio-Manguinhos.

A ligação positiva e negativa é observada pela formação ou não de cor, a qual ocorre uma mudança de azul para amarelo. Quando o vírus da FA se liga ao anticorpo presente no soro amostral, não se observa a mudança na coloração (coloração azul). A coloração amarela é observada quando há ausência de anticorpos ao vírus da FA no soro amostral, logo não ocorre ligação (reação negativa). A figura 8 representa as reações positivas e negativas na quantificação dos anticorpos contra o vírus FA pelo método de ViBI.

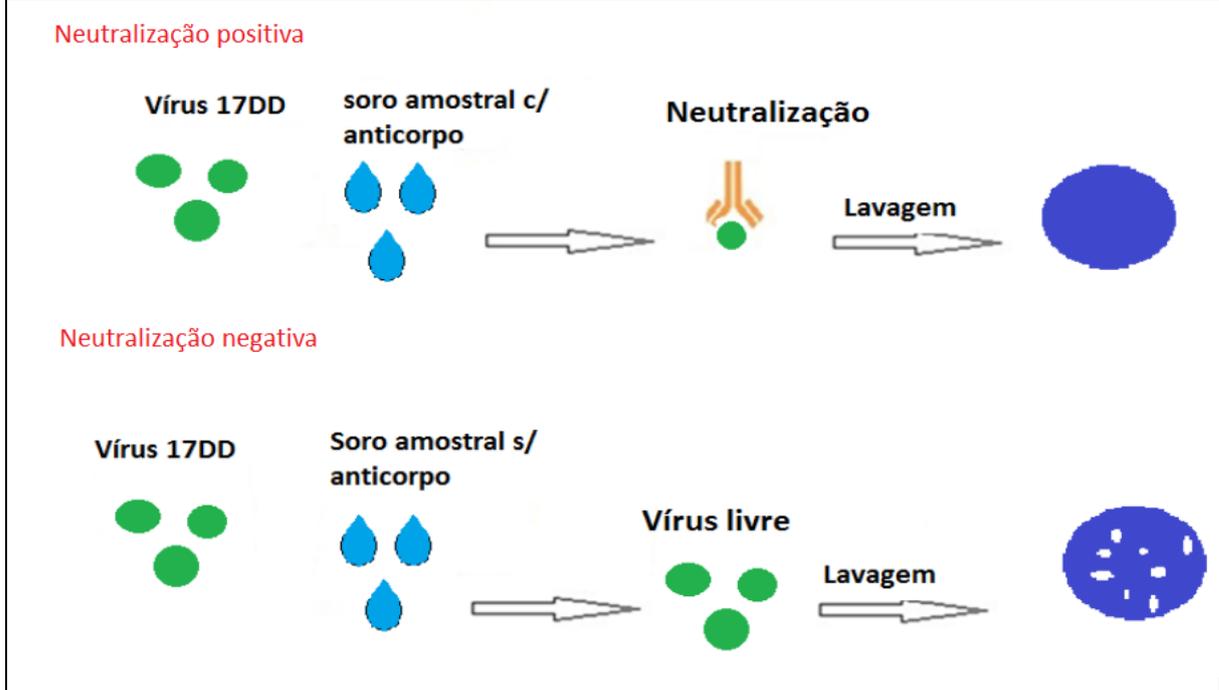
Figura 8: Esquema da ligação positiva e ligação negativa para o método ViBI.



Fonte: Desenvolvimento Bio-Manguinhos.

Na figura 9, podemos observar a neutralização positiva e negativa para o método de PRNT. Quando o anticorpo presente no soro do indivíduo neutraliza o vírus, não observamos o efeito citopático que o vírus causa as células, logo não há formação de pacas, já quando o soro do indivíduo não possui anticorpos para neutralizar o vírus, este fica livre para promover o efeito citopático, isto é, para causar dano as células, logo podemos observar as placas.

Figura 9: Esquema da ligação positiva e ligação negativa para o método PRNT.



Fonte: Desenvolvimento Bio-Manguinhos.

4.2.2. Cálculos dos títulos das amostras

As concentrações calculadas para o teste de neutralização são expressas em forma de títulos, ou seja, a diluição do soro que reduz o número de placas de lise em 50% (EP_{50}) e o ponto de corte para o método, estabelecido em 794 mUI/mL por Simões e colaboradores (2012). Para o cálculo dos resultados das amostras tituladas pelo método ViBI foram realizadas as leituras das placas, as quais foram calculadas utilizando o cálculo de regressão não linear de 4 parâmetros pelo programa de análise SoftMax Pro versão 5.4 (Molecular Devices – USA).

Também foram realizadas análises estatísticas não paramétricas, para identificar possíveis diferenças entre os resultados obtidos com os métodos PRNT e ViBI.

4.2.3. Curva de avaliação de positividade

O objetivo deste teste foi determinar a melhor concentração para estimar o limite de positividade e conseqüentemente o ponto de corte do método ViBI.

Foram realizadas duas abordagens para a avaliação do ponto de corte, a primeira, foi realizada pela avaliação de 4 curvas de calibração com soro de referência da NIBSC (código: YF) nas concentrações 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,5; 16,5 e 8,0 mUI/mL. A segunda foi avaliada pela titulação de 30 soros positivos para a FA, neste foi observado a capacidade do método de quantificar com veracidade tais soros.

4.2.4. Comparação dos resultados obtidos pelos métodos PRNT e ViBI

Foram avaliados 39 soros (pré e pós) vacinação utilizando os métodos PRNT e ViBI para quantificação de IgG, nos tempos de 0 e 30 dias após imunização com a vacina de FA. Para avaliação do coeficiente de correlação entre os métodos foi utilizado o teste de Spearman. O teste Mann Whitney e Wilcoxon foram utilizados para comparar as diferenças entre os resultados obtidos nos métodos PRNT e ViBI, a tabela 4 resume a aplicabilidade de cada um dos testes estatísticos. Os resultados do PRNT são oriundos de uma parceria do LATIM com o LATEV.

Tabela 4: Resumo da aplicabilidade de cada teste estatístico

Testes estatísticos		
Teste	O que é?	Para que serve?
Mann-Whitney	É um teste não paramétrico, não pareado, aplicado para duas amostras independentes.	Testa a igualdade das medianas.
Spearman	É uma mediada de correlação de dados não paramétricos.	Mede a intensidade da relação entre variáveis.
Wilcoxon	É um teste não paramétrico para comparação de duas amostras pareadas.	É utilizado para comparar se as medidas de posição de duas amostras são iguais.

Fonte: Desenvolvimento Bio-Manguinhos.

4.2.5. Avaliação da validade/acurácia do método ViBI

Para determinar a validade/acurácia do método ViBI foram comparados os resultados obtidos pelo ViBI com os resultados obtidos pelo PRNT (padrão ouro) em 30 soros amostrais de indivíduos pré e pós vacinados. Este estudo é importante para avaliar a sensibilidade e especificidade entre os métodos.

4.3. Validação do método de ViBI

4.3.1. Protocolo de validação bioanalítica

Foram definidas as diretrizes e critérios para realização da validação do método para dosagem de anticorpos IgG anti-FA de forma a demonstrar a correta execução do procedimento e que o mesmo conduza a resultados confiáveis e adequados. Nesta avaliação foram realizados os testes de seletividade, curva de calibração, precisão (intra e intercorrida), exatidão (intracorrida), limite de detecção e o limite de quantificação.

4.3.2. Seletividade

A seletividade foi avaliada com a utilização de 6 soros para dengue sorotipos 1, 2, 3 e 4, referência NIBSC 02-186 (soro anti dengue), independentes entre si, objetivando analisar a capacidade do método em não quantificar anticorpos inespecíficos.

4.3.3. Curva de calibração

Foram construídas e avaliadas 6 curvas de referência que incluíram a análise da amostra branca, e as seguintes concentrações: 20000; 15000; 10000; 5000; 2500; 1250; 625; 312,5; 156,25; 78,12; 39,06 e 19,53 mUI/mL. As curvas foram realizadas com soro de referência YF da NIBSC.

4.3.4. Precisão

4.3.4.1. Intracorrída

Foram avaliados os resultados obtidos de 3 concentrações diferentes com 8 replicadas cada uma. O analista para este procedimento foi nomeado A e o procedimento foi realizado uma vez. A precisão intracorrída foi realizada com amostras clínicas. O esquema de repetição para a precisão intracorrída está representado no quadro 3.

Quadro 3: Esquema de repetições para a precisão intracorrida.

As concentrações foram nomeadas em alta, média e baixa concentração.		
Alta	Média	Baixa
1ª replicada	1ª replicada	1ª replicada
2ª replicada	2ª replicada	2ª replicada
3ª replicada	3ª replicada	3ª replicada
4ª replicada	4ª replicada	4ª replicada
5ª replicada	5ª replicada	5ª replicada
6ª replicada	6ª replicada	6ª replicada
7ª replicada	7ª replicada	7ª replicada
8ª replicada	8ª replicada	8ª replicada

4.3.4.2. Intercorrida

Para obter os resultados da intercorrida o analista A executou o procedimento descrito no item 4.3.4.1 em três dias diferentes. A precisão intercorrida foi realizada com amostras clínicas.

A resposta do teste de precisão foi calculada conforme abaixo:

$$CV (\%) = \frac{(\text{Desvio Padrão}) \times 100}{\text{Concentração média experimental}}$$

4.3.5. Exatidão

4.3.5.1. Intracorrida

Foram avaliados os resultados obtidos de 5 concentrações diferentes com 6 replicadas cada uma. O analista desta análise foi nomeado A e o procedimento foi realizado uma vez. A exatidão foi realizada com soro de referência NIBSC. O esquema de repetição para a exatidão intracorrida foi representado no quadro 4.

Quadro 4: Esquema de repetições para a exatidão intracorrída.

CQD é uma amostra de controle de qualidade de diluição, CQA é uma amostra de controle de qualidade de alta concentração, o CQM é uma amostra de controle de qualidade de média concentração, o CQB é a amostra de controle de qualidade de baixa concentração e o LIQ (limite inferior de quantificação).				
CQD	CQA	CQM	CQB	LIQ
1ª replicada	1ª replicada	1ª replicada	1ª replicada	1ª replicada
2ª replicada	2ª replicada	2ª replicada	2ª replicada	2ª replicada
3ª replicada	3ª replicada	3ª replicada	3ª replicada	3ª replicada
4ª replicada	4ª replicada	4ª replicada	4ª replicada	4ª replicada
5ª replicada	5ª replicada	5ª replicada	5ª replicada	5ª replicada
6ª replicada	6ª replicada	6ª replicada	6ª replicada	6ª replicada

4.3.6. Limite de detecção

Para se obter o limite de detecção, foram analisadas amostras de concentrações conhecidas e decrescentes do soro de referência, até o menor nível detectável. O procedimento foi realizado em sextuplicada.

4.3.7. Limite de quantificação

Para se obter o limite de quantificação, foram analisadas amostras de concentrações conhecidas e decrescentes do soro de referência até o menor nível determinável. O procedimento foi realizado em sextuplicada.

4.4. Análises estatísticas

A análise estatística foi avaliada através dos coeficientes de variação (CV) dos resultados obtidos nos parâmetros estabelecidos, utilizando uma planilha de cálculo (Excel). O CV é uma medida de dispersão relativa, correspondendo ao desvio-padrão em relação a média e expresso em porcentagem. Quanto menor o CV mais homogêneo é o conjunto de dados (Toledo & Ovalle, 1995).

4.5. Critério de aceitação

Para que o método seja considerado validado, os critérios de aceitação devem ser aprovados. O quadro 5 representa o critério de aceitação para considerar o método validado.

Quadro 5: Critérios de aceitação da validação do método de ViBI.

Os resultados extraídos da seletividade, curva de calibração, precisão, exatidão e dos limites de detecção e quantificação, são submetidos aos critérios descritos abaixo. Nos quais são estabelecidos os valores de CV e EPR.	
Parâmetro	Critério de Aceitação
Seletividade	Demonstrar positividade para o soro referência para dengue sorotipos 1, 2, 3 e 4.
Curva de calibração	-CV% ≤ 20% em relação à concentração nominal para a diluição do LIQ. -CV% ≤ 15% em relação à concentração nominal para as demais diluições. -75% das diluições aprovados de acordo com os critérios acima.
Precisão	CV % ≤ 15%
Exatidão	EPR ± 15% e LIQ ± 20%
Limite de detecção	A determinar
Limite de quantificação	A determinar

Fonte: Brasil, 2012; Brasil, 2003.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

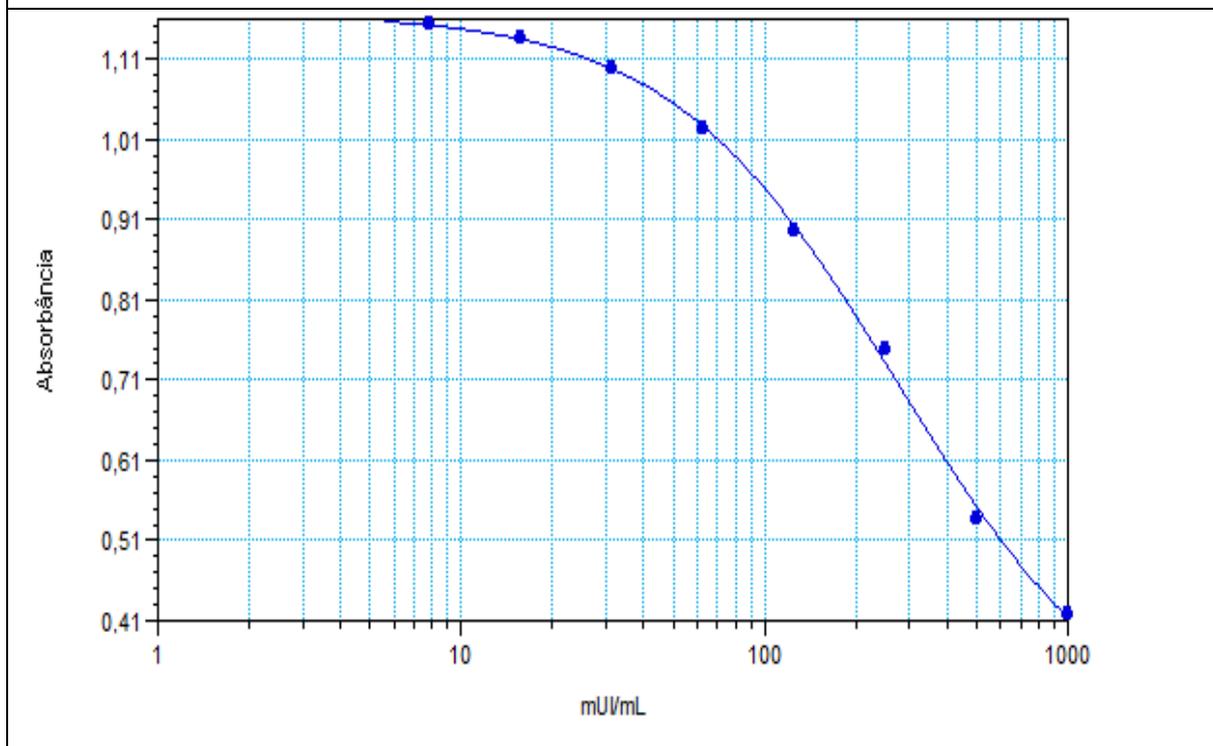
5.1. Curva de avaliação de positividade

Foram realizados, independentemente, 4 ensaios pelo método ViBI com soro referência NIBSC, a fim de observar as curvas do padrão. Os valores foram expressos em absorvância (D.O.) e suas médias, desvios padrão e os percentuais de coeficiente de variação obtidos a partir dos quatro experimentos.

O gráfico 1 mostra a média das 4 curvas de calibração realizadas com o soro referência.

Gráfico 1: Curva de avaliação de positividade.

Representação da média das quatro curvas de avaliação da positividade. No eixo Y são as (D.O.) das leituras encontradas no leitor de ELISA e no eixo X são valores de quantificação encontrados pelo ViBI.



Através destas curvas foi possível estimar a concentração que define o melhor ponto de corte do método. Este ponto de corte do método foi considerado no platô do gráfico, onde pode ser observado que nesta concentração não são mais percebidas mudanças na dosagem de anticorpos – isto foi observado na concentração de 125 mUI/mL. Os valores de D.O. foram obtidos em espectrofotômetro e foram calculadas as médias dos 4 experimentos, assim como o desvio padrão e o coeficiente de variação. Foi possível avaliar também que as curvas obedecem aos critérios de aceitação segundo a RDC nº 27/2012 (Brasil, 2012), pois os valores dos títulos quando avaliados pelo coeficiente de variação ficaram com resultados menores de 15%, logo, observa-se que os resultados alcançados para a avaliação da curva de positividade corresponderam à expectativa do método.

Todos os coeficientes de variação encontrados ficaram dentro do valor especificado esperado. É importante destacar que o valor para o CV encontrado na concentração de 125 mUI/mL, foi de 10,21%, estando este abaixo do limite especificado pela RDC nº27/2012 que é de 15% (Brasil, 2012). As leituras de D.O. estão no quadro 6.

Quadro 6: Resultados dos valores de quantificação da curva de positividade.

Representação das médias de 4 experimentos independentes e seus respectivos DP e CV%.											
mUI/mL	Curva exp.1		Curva exp.2		Curva exp.3		Curva exp.4		Média	DP	CV%
1000	0,462	0,439	0,382	0,466	0,503	0,497	0,447	0,456	0,456	0,035	7,716
500	0,686	0,668	0,613	0,570	0,589	0,552	0,500	0,512	0,586	0,063	10,742
250	0,867	0,826	0,793	0,861	0,737	0,779	0,792	0,885	0,818	0,048	5,839
125	0,978	0,905	0,907	1,023	0,847	0,812	1,041	1,117	0,954	0,097	10,211
62,5	1,064	0,996	1,112	1,173	0,899	1,020	1,067	1,100	1,054	0,078	7,380
31,5	1,034	1,027	1,229	1,285	1,003	1,207	1,044	1,089	1,115	0,102	9,139
16,5	1,109	1,047	1,400	1,324	1,112	1,174	0,957	1,074	1,150	0,137	11,913
8,0	1,113	1,062	1,467	1,606	1,058	1,133	0,860	1,022	1,165	0,230	19,783

Com o objetivo de considerar os resultados encontrados acima de 125 mUI/mL como respostas positiva para a presença de anticorpos IgG anti febre amarela, foi definido este valor como sendo o ponto de corte do método.

Para comprovação desse ponto, também foram avaliados 30 soros de indivíduos vacinados e as amostras foram submetidas ao método de ViBI, desse total, foi possível obter um resultado positivo para o ponto de corte de 125mUI/mL para 29 soros, confirmando então, o valor estabelecido para o método. A representação gráfica está demonstrada no gráfico 2.

Gráfico 2: Ponto de corte estabelecido em 30 soros de indivíduos pós-vacinados.

No eixo X está apresentado o número de indivíduos vacinados. No eixo Y, a concentração encontrada pelo ViBI.



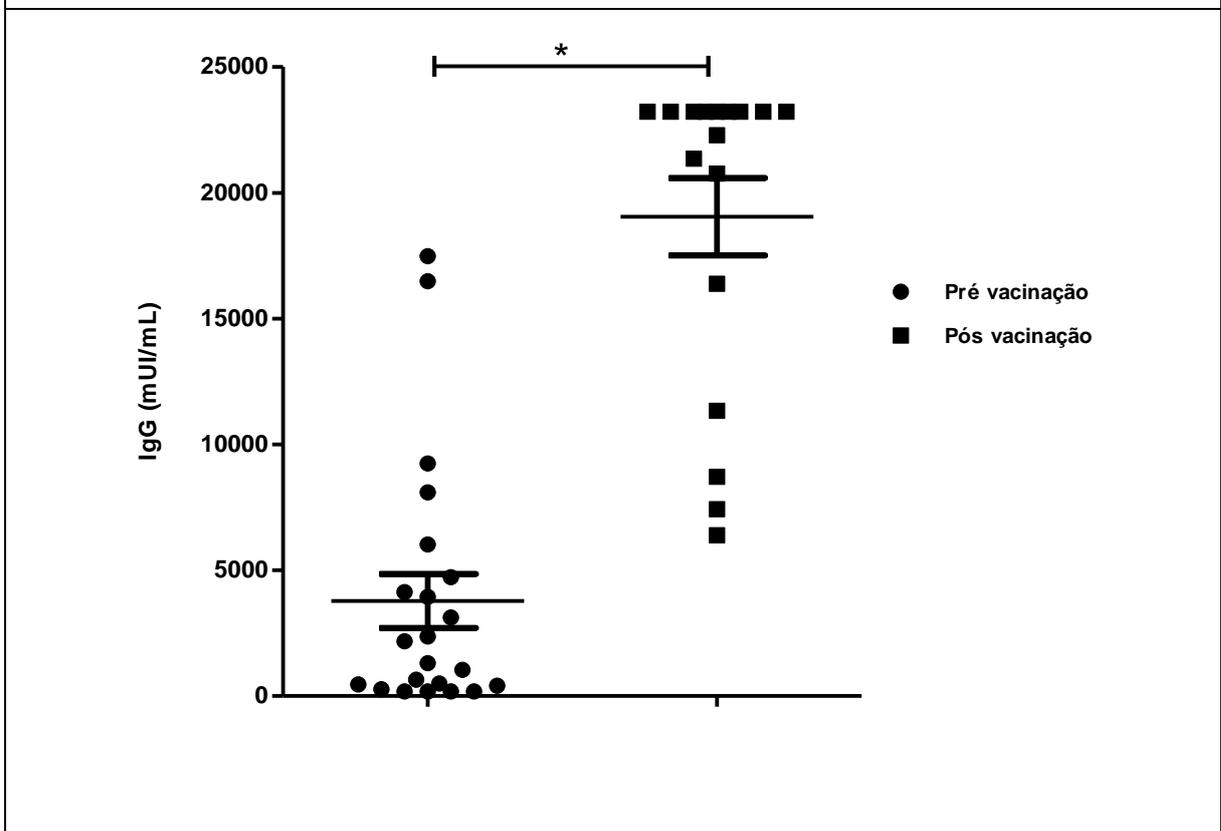
5.2. Avaliação dos títulos de IgG pelos métodos PRNT e ViBI

Trinta e nove soros de indivíduos que receberam a vacina de Febre Amarela 17DD, tempos 0 (pré) e 30 (pós), foram utilizados para avaliar os títulos de anticorpos IgG contra FA pelos métodos de PRNT e ViBI.

Utilizando o PRNT para titular os níveis de anticorpos neutralizantes contra FA foram observados que dos 39 soros pré-vacinados, 13 ficaram acima do ponto de corte (794 mUI/mL), e somente 9 soros tiveram títulos inferiores ao limite mínimo de detecção, como esperaríamos ocorrer. Este resultado sugere que talvez alguns indivíduos não seriam primo vacinados, e, portanto, apresentariam anticorpos prévio a vacinação. Todos os soros pós-vacinação foram considerados positivos e apresentaram altos títulos de IgG, o teste estatístico não pareado e não paramétrico Mann-Whitney mostrou uma diferença estatisticamente significativa, $P < 0,0001$, entre os títulos dos soros pré e após vacinação ($P < 0,0001$), como já esperado. Os soros dos indivíduos vacinados avaliados neste estudo apresentaram 100% de conversão com um aumento mínimo de > 7 vezes nos títulos de IgG, como representado no gráfico 3.

Gráfico 3: PRNT – Comparação dos títulos de anticorpos IgG pré e pós-vacinação.

Os resultados mostram os títulos de anticorpos a mediana e desvio padrão dos soros pré e pós-aplicação da vacina contra a vacina FA. Os títulos de IgG foram expressos em mUI/mL. $P < 0,0001$.

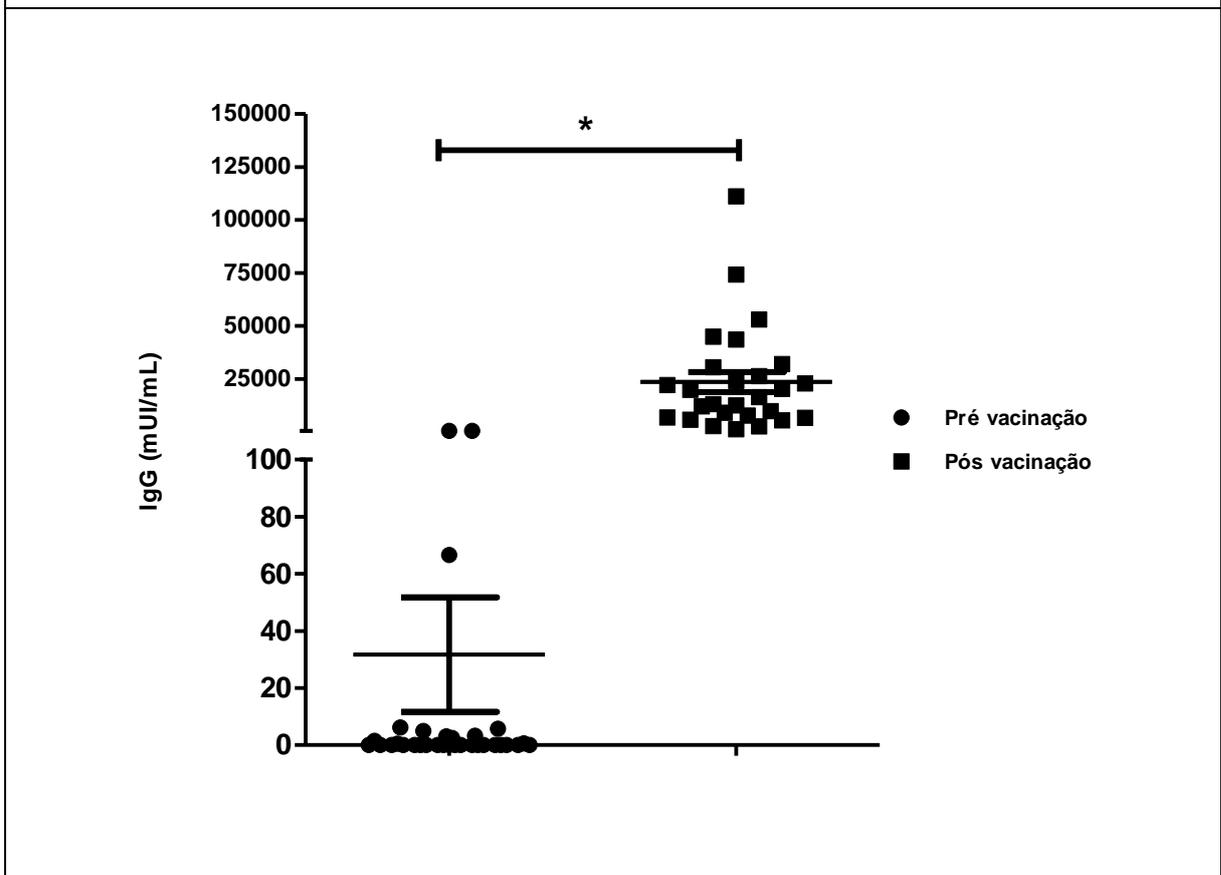


Quando o método ViBI foi utilizado para quantificar os títulos de anticorpos IgG foi observado um perfil diferente, nos soros pré e pós-vacinação, em relação aos resultados obtidos com o PRNT. Foi observado que 2 soros dos indivíduos pré-vacinados apresentaram anticorpos anti IgG acima do ponto de corte (125 mUI/mL).

Assim como no PRNT, todos os soros pós-vacinação testados com o ViBI foram considerados positivos e apresentaram títulos a partir de 1000 mUI/mL de IgG. O teste estatístico Mann-Whitney também mostrou uma diferença estatisticamente significativa, $P < 0,0001$, entre os títulos dos soros pré e após vacinação. Os soros dos indivíduos vacinados avaliados neste estudo apresentaram 100% de conversão com títulos de IgG, como representado no gráfico 4.

Gráfico 4: ViBI – Comparação dos títulos de anticorpos IgG pré e pós-vacinação.

Os resultados mostraram os títulos de anticorpos, a mediana e desvio padrão dos soros pré e pós-aplicação da vacina contra a vacina FA. Os títulos de IgG foram expressos em mUI/mL. $P < 0,0001$.

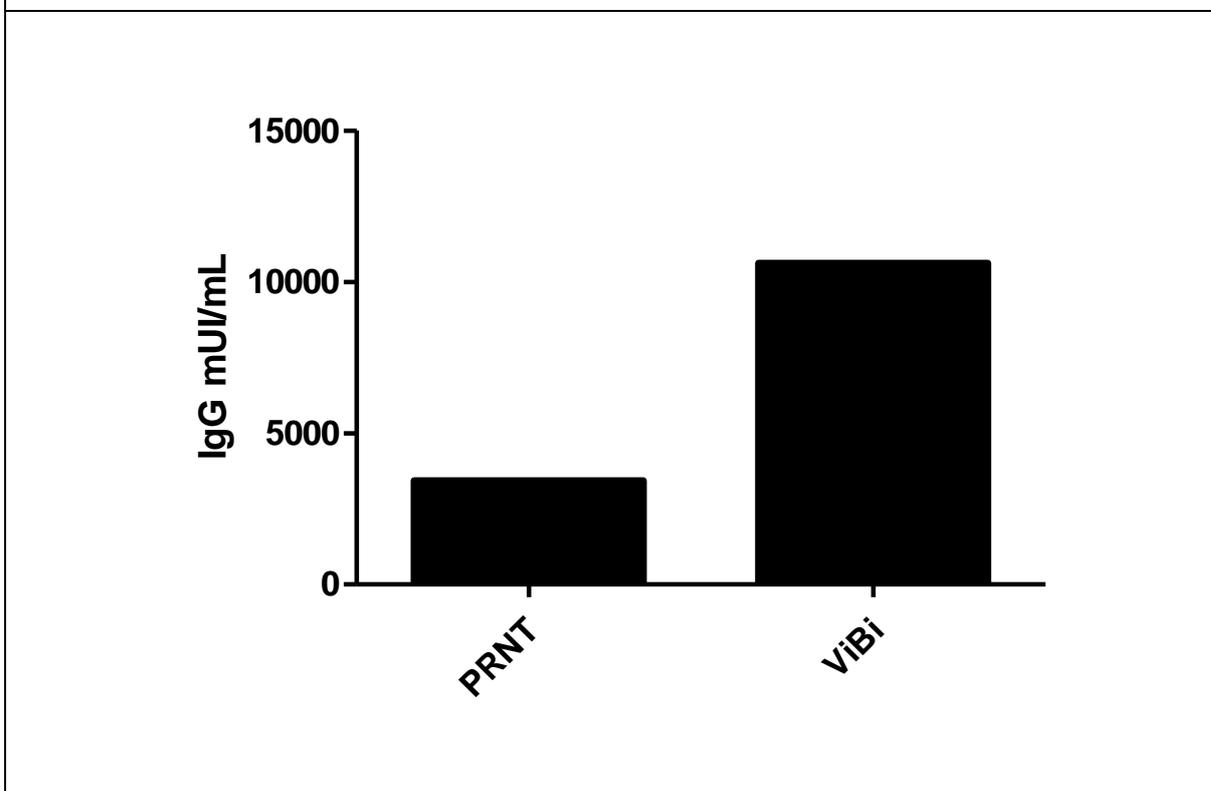


testes, comprovou que não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,1239$) entre eles.

Estes dados sugerem que o método ViBI pode ser utilizado para avaliação de anticorpos IgG contra FA em soros de indivíduos após 30 dias de vacinação, apresentando resultados equivalentes aos obtidos com o PRNT.

Gráfico 6: Comparação entre os títulos de IgG testados pelos métodos ViBI e PRNT.

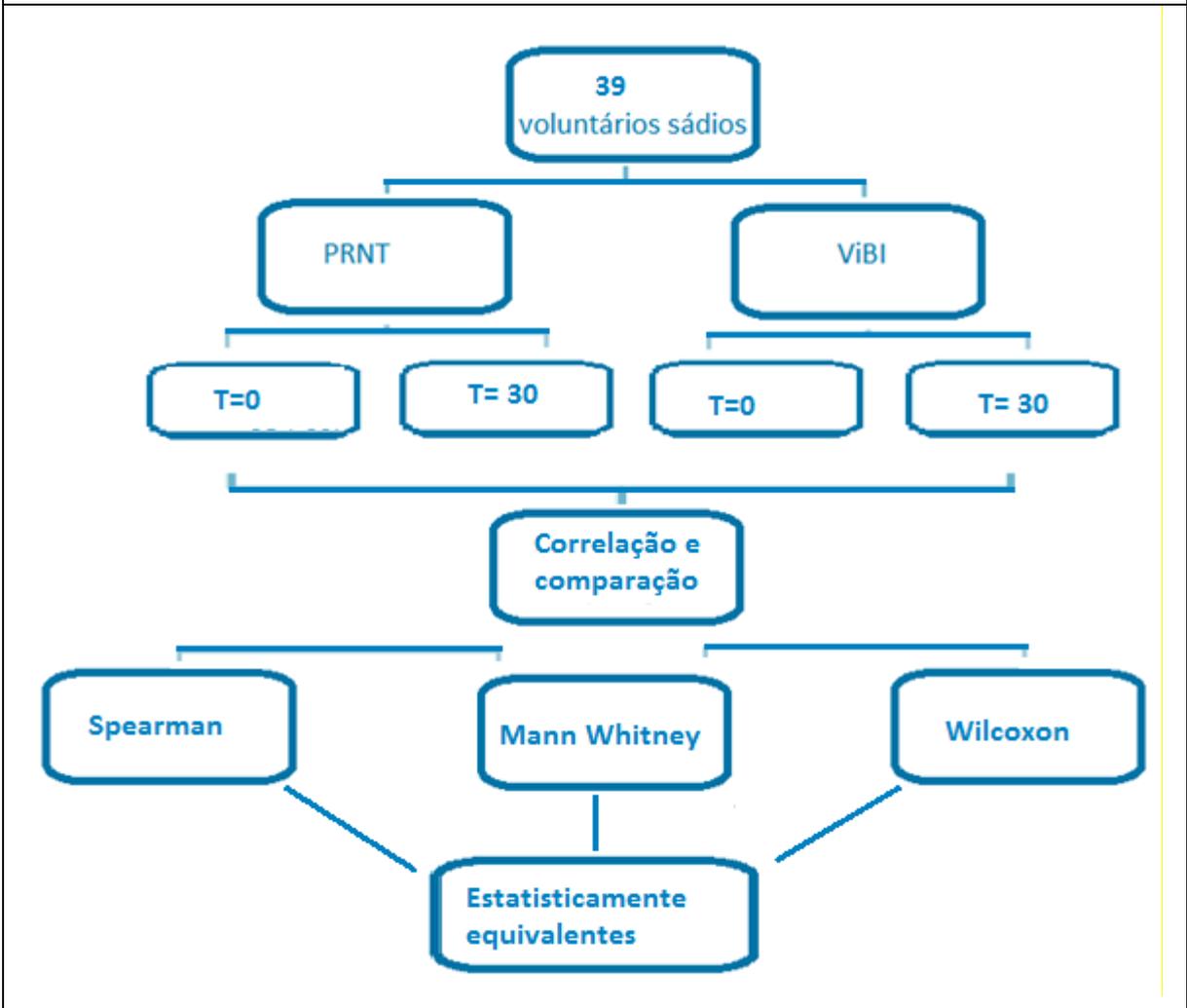
Média geométrica dos títulos de anticorpos IgG contra FA presentes nos soros 30 dias após vacinação.



Resumidamente, as avaliações realizadas para comparar os níveis de anticorpos IgG pelos métodos PRNT e ViBI para os 39 soros amostrais foi compilada em forma de fluxograma e está apresentado na figura 10.

Figura 10: Resumo da avaliação da concentração de anticorpos IgG pelos métodos PRNT e ViBI.

39 voluntários sádios avaliados no tempo (T) zero e 30 dias.



5.3. Validade/acurácia do método ViBI

Para avaliar a validade/acurácia do ViBI foi determinado a concentração de anticorpos IgG em 30 soros amostrais de indivíduos pré e pós vacinados em comparação ao método PRNT para avaliar a sensibilidade e especificidade entre os métodos de acordo com a tabela 5. O quantitativo de soros utilizados foi limitado a 30 soros devido à pouca amostra para o estudo. A validade ou acurácia de um teste representa, em termos quantitativos ou qualitativos, quanto um teste é útil para

diagnosticar um evento (validade simultânea ou concorrente) ou para predizê-lo (validade preditiva).

Para determinar a validade, comparam-se os resultados do teste com os de um padrão (padrão ouro). O teste ideal deveria fornecer, sempre, a resposta correta, ou seja, um resultado positivo nos indivíduos vacinados e um resultado negativo nos indivíduos não vacinados.

Tabela 5: Avaliação da validade/acurácia do ViBI.					
Sensibilidade dos testes de 96,67% para ambos os métodos.					
	ViBI		PRNT		
	Ponto de corte > 125 mUI/mL		Ponto de corte > 794 mUI/mL		
	Verdadeiro positivo	Falso-positivo	Verdadeiro positivo	Falso-positivo	
Número de casos	29	23	29	19	
	Falso -negativo	Verdadeiro negativo	Falso -negativo	Verdadeiro negativo	
	1	7	1	11	
Total de dosagens	60		60		
Sensibilidade (%)	96,67		96,67		
Especificidade (%)	23,33		36,67		
Acurácia global (%)	60%		66%		

Na tabela acima foi demonstrada que a sensibilidade, isto é, a capacidade do método de detectar os soros dos indivíduos verdadeiramente positivos para ambos os testes foi equivalente, sendo o resultado de 96,67%.

Portanto, a sensibilidade (S) é a relação de verdadeiro positivo pela soma dos valores de verdadeiro positivo e falso negativo ($S = a / (a + c)$). (Hatanaka & Benseñor, 2005).

A especificidade, teve um percentual de diferença de 13%, comparando os valores encontrados para o ViBI que foi de 23,33% e para o PRNT foi de 36,67%, esta considera a capacidade do método em detectar os soros dos indivíduos verdadeiramente negativos, isto é, para os soros pré-vacinados. Portanto, a

especificidade (E) é a relação de verdadeiro negativo pela soma dos falsos positivo e verdadeiro negativo ($E = d / (b + d)$) (Hatanaka & Benseñor, 2005).

5.4. Validação do método ViBI

Para demonstrar que o método ViBI é apropriado para a finalidade pretendida, isto é, a quantificação de anticorpos IgG anti vírus da Febre Amarela e estimar a eficiência, foram utilizados os parâmetros de validação que foram seletividade, curva de calibração, precisão, exatidão, precisão, limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ), conforme preconizado na RDC nº 27/2012. (Brasil, 2012).

O objetivo da validação do ViBI foi o de fornecer elementos para garantir que o método é tão confiável quanto ao método PRNT. Não há dúvidas quanto às vantagens de se implementar um teste realizado por ELISA, por ser um método com redução de tempo e totalmente instrumental, mostrando-se menos sujeito a variações, e realizados em menores períodos de tempo. Porém, como o ViBI não consta na Farmacopeia Brasileira (2010), há a necessidade de legitimá-lo, demonstrando sua confiabilidade e relevância.

5.4.1. Seletividade

A seletividade e a especificidade estão relacionadas ao evento da detecção e, atualmente, existe muita confusão na interpretação desses termos. Por exemplo, um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico; um método que produz respostas para vários analitos, por sua vez, é chamado seletivo.

Entretanto, os termos especificidade e seletividade são frequentemente utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações. O objetivo da seletividade nesta validação foi de confirmação do método para os Flavivírus, nas diferentes amostras de soros positivos, isto é, presença de anticorpos contra febre amarela e dengue. Foi escolhido soro referência contendo anticorpos contra diferentes sorotipos

(1, 2, 3 e 4). O parâmetro especificidade não foi realizado, pois não é preconizado pela RDC nº 27/2012.

O estudo da seletividade foi realizado para avaliar se a matriz da amostra pode conter componentes que possam interferir no desempenho da medição. Por isso, foram avaliadas amostras de soro humano positivas com anticorpos IgG FA e amostras em branco (soro sem o vírus).

Os dados apresentados na tabela 6 evidenciam que a seletividade é satisfatória para os flavivírus (dengue e FA), porém não demonstrou nenhum resultado positivo para o branco, como esperado.

Tabela 6: Dados para avaliação da seletividade.

A avaliação foi realizada pelo (CV) e resultado das médias. As amostras do branco não apresentaram leitura quantificável.

	Branco	Dengue tipos 1, 2, 3 e 4	Soros positivos (FA)
Concentrações	0,0500 0,0547 0,0458	764,32	7874,09
		748,75	6913,60
		776,56	6629,66
		755,58	5900,04
		780,19	6151,63
		759,25	5109,77
Média	0,0502	764,11	6429,80
Desvio Padrão	0,00	12,22	944,51
CV (%)	8,87	1,60	14,69

É muito importante ressaltar que o teste ViBI foi desenvolvido para avaliação principalmente de soros amostrais de indivíduos já vacinados pela vacina 17DD.

Este método pode ser uma alternativa mais rápida frente ao método de PRNT “ouro” e em pesquisas clínicas direcionadas à vacina de febre amarela.

Foram também realizados como confirmação para o resultado da seletividade a titulação de 10 soros amostrais de crianças de 3 meses de idade, gentilmente cedidas para este estudo, nos quais, foram obtidos resultados negativos para todas as amostras (dados não apresentados).

Por fim, a seletividade foi estudada para determinar a capacidade do método em quantificar os anticorpos para o vírus da febre amarela, tendo sido desafiada com os flavivírus da dengue e amostra de soro em branco e foi encontrado um excelente

resultado, já que a seletividade foi demonstrada para as amostras desafio. Isto significa dizer que o método apresenta seletividade para flavivírus sem apresentar interferência da matriz.

5.4.2. Curva de calibração

A curva de calibração foi realizada para demonstrar a relação entre a resposta do equipamento leitor de ELISA e a concentração conhecida do analito, sendo avaliada em mUI/mL.

A curva de calibração foi realizada segundo a metodologia proposta nesta dissertação, e observou-se que, na concentração de 78,12 mUI/mL, a resposta para a quantificação apresentava-se irregular, isto é, não apresentou quantificação em todas as repetições. Assim, a concentração de corte deve situar-se entre 78,12 mUI/mL e 156,25 mUI/mL.

A curva de calibração permitiu definir as 5 concentrações distintas (CQB, CQM, CQA, CQD e LIQ) necessárias para a validação, são elas: amostra de concentração baixa, amostra de concentração média, amostra de concentração alta e concentração acima do maior valor da curva e o limite inferior de quantificação. As mesmas, posteriormente, foram utilizadas para avaliar os parâmetros de precisão intracorrida e intercorrida e a exatidão intracorrida do método.

Os títulos observados de cada uma das amostras foram definidos a partir da média das 6 replicadas. O quadro 7 apresenta os títulos obtidos de cada soro referência da curva de calibração calculados em mUI/mL.

Quadro 7: Valores em DO da curva de calibração, resultados obtidos pelo método ViBI.

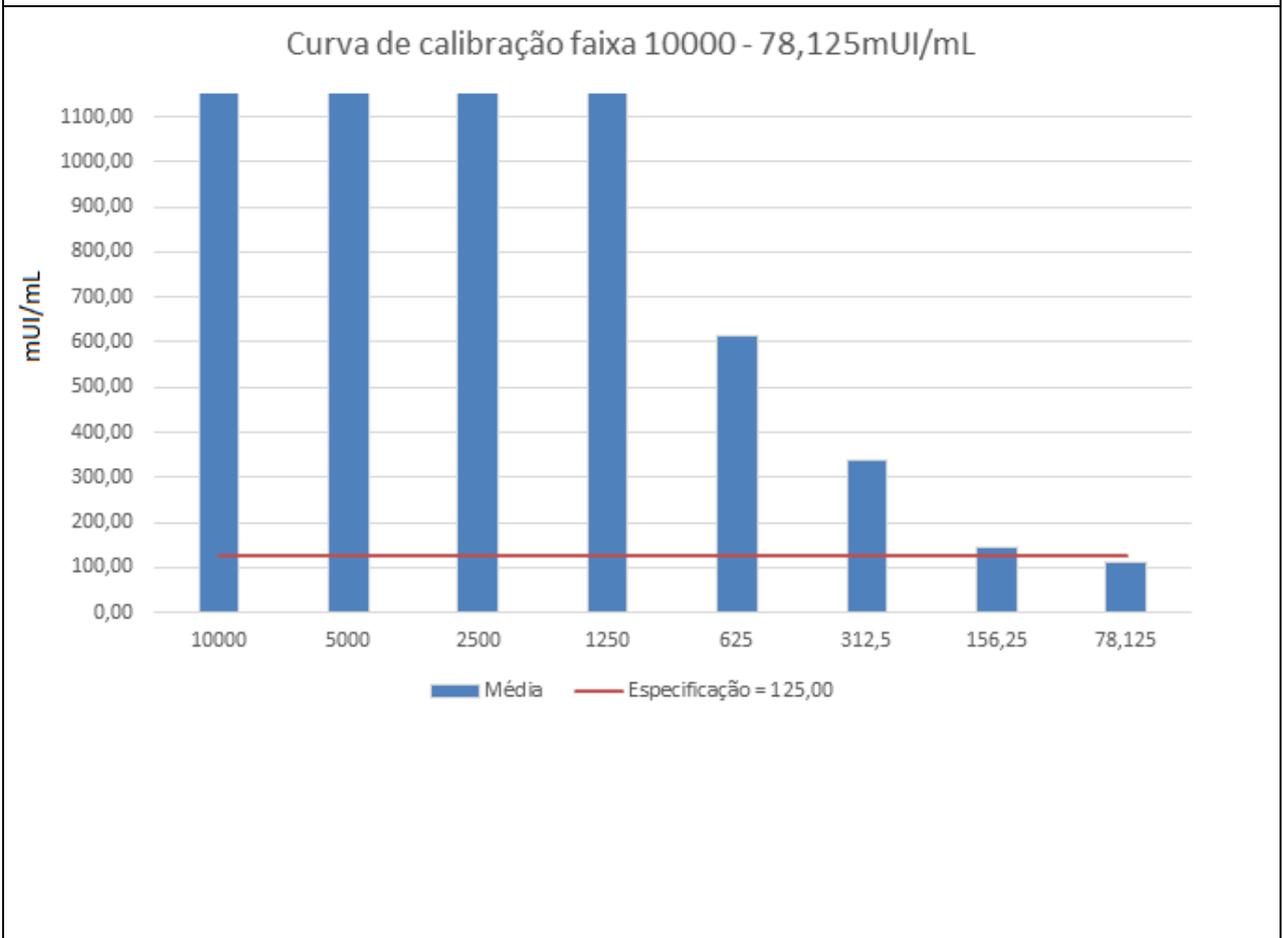
Os resultados foram expressos pelo (CV%) e a melhor faixa de trabalho foi determinada entre os valores de 10000 a 78,125 mUI/mL.											
mUI/mL	20000	15000	10000	5000	2500	1250	625	312,5	156,25	78,125	39,063
Curva 1	15768,78	15975,13	10401,33	4315,71	2410,03	1136,05	675,80	369,24	141,71	110,94	-
Curva 2	12515,73	11092,35	11114,87	5408,85	2840,45	1163,06	586,25	359,54	149,48	155,75	46,50
Curva 3	10734,62	11179,24	9490,94	5514,70	2744,79	1134,72	596,95	317,89	131,59	114,95	41,89
Curva 4	8623,28	11880,50	10530,88	5323,38	2635,28	1168,73	617,76	310,66	150,59	110,28	39,52
Curva 5	12489,06	11095,77	11067,40	5439,03	2845,43	1160,87	585,79	361,04	149,68	70,69	46,98
Curva 6	9057,36	10907,45	11835,28	5430,95	2792,51	1149,61	614,66	310,70	148,90	-	-
CV %	22,96	18,53	7,41	8,71	6,15	1,25	5,50	8,22	5,14	26,78	8,28
Média	11531,47	12531,81	10740,12	5238,77	2711,42	1152,17	612,87	338,18	145,33	112,52	43,72

A partir da amostra 78,125 mUI/mL não foi possível observar quantificação que evidencie a presença de anticorpos. Também pode-se observar que a melhor faixa de trabalho apresentada pela curva de calibração foi entre 10000 a 78,125 mUI/mL, já que os valores do coeficiente de variação (CV) ficaram dentro da especificação determinada pela RDC nº 27/2012 da ANVISA (Brasil, 2012).

Ao representar graficamente esses resultados, observa-se uma linha de tendência do ponto de corte para os resultados encontrados, conforme apresentado no gráfico 7.

Gráfico 7: Curva de calibração.

No eixo Y encontram-se os resultados médios na quantificação dos soros, no eixo X, encontram-se os resultados da concentração da curva de referência. A linha vermelha indica o valor de positividade de 125 mUI/mL (ponto de corte).



Com base nesses resultados, foi calculada a média global de cada diluição da amostra, ou seja, considerando o resultado das seis curvas de calibração, de forma a contemplar as cinco concentrações determinadas pela RDC nº 27/2012 (Brasil, 2012) da ANVISA, como mostra o quadro 8.

Quadro 8: Definição do valor nominal de cada concentração da curva.

Concentrações da curva	Nominal	Média das seis curvas
CQD	15000	12021,74
CQA	10000	10740,12
CQM	1250	1152,17
CQB	312,5	338,18
LIQ	156,25	145,33

A curva de calibração no estudo de validação foi determinada na faixa de 10000, 5000, 2500, 1250, 625, 312,5, 156,25 e 78,125 mUI/mL, demonstrada nas seis curvas realizadas. Esses resultados estão de acordo com a RDC nº27/2012, que estabelece como critério mínimo aceitável um coeficiente de variação de $\leq 15\%$ para o LIQ e $\leq 20\%$ para as concentrações das amostras de controle de qualidade (Brasil, 2012).

5.4.3. Precisão

De acordo com a RDC nº 27/2012 da ANVISA, o estudo da precisão para validação de um método deve ser realizado com uma única fonte de matriz biológica, e isso é entendido como o meio de origem biológica no qual os analitos em estudo foram quantificados (Brasil, 2012).

Por esta questão, não foi possível determinar a precisão com as 5 concentrações determinadas pela ANVISA, pois não foram encontradas nos soros titulados essas especificações de concentração.

Portanto, o estudo da precisão foi realizado com amostras de soro humano em concentrações alta, média e baixa, considerando que a RE nº 899/2003 da ANVISA

prevê este tipo de validação, nessas concentrações, optou-se por utilizar este protocolo (Brasil, 2003).

Um ensaio foi realizado para calcular o grau de dispersão da precisão intracorrída e o CV, demonstrado no quadro 9.

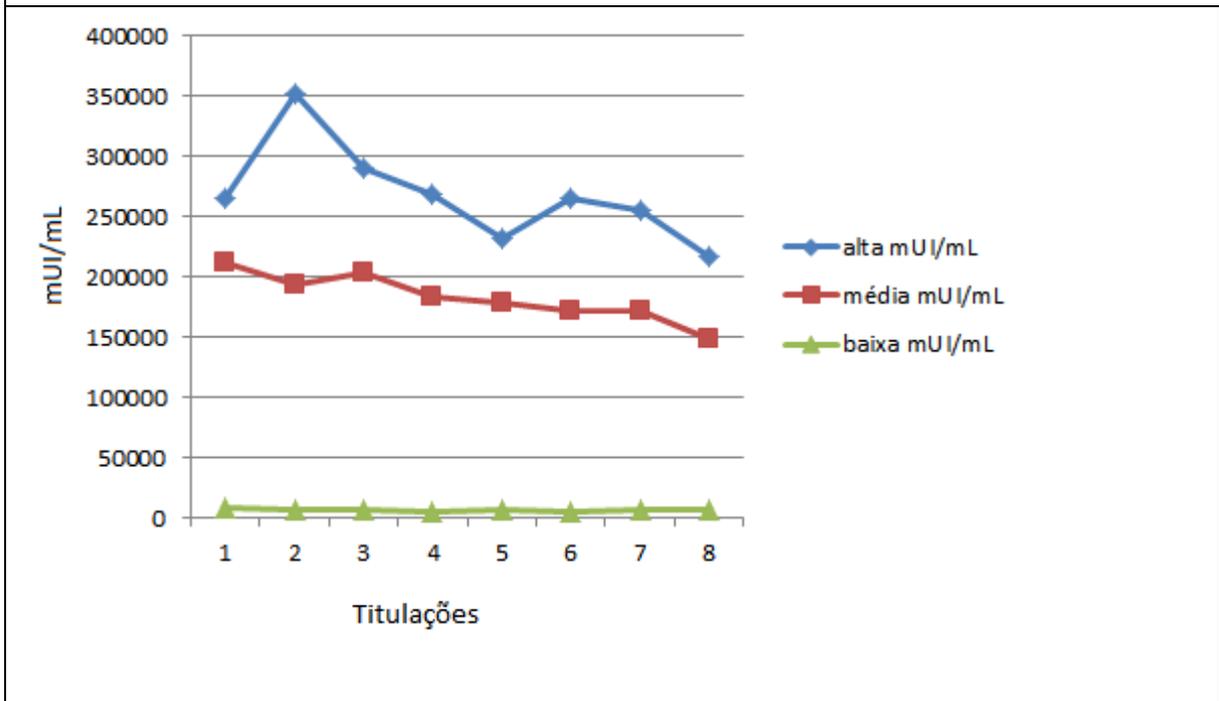
Quadro 9: Estudo da precisão intracorrída.

Calculo do CV dos resultados obtidos pelo método ViBI expressos em mUI/mL de cada uma das concentrações.			
Réplicas	Alta	Média	Baixa
1	265011,29	211579,51	7874,09
2	352000,76	194137,40	6913,60
3	291123,77	202852,79	6629,66
4	268424,72	183772,36	5900,04
5	231520,89	178267,84	6151,63
6	266136,56	171780,49	5109,77
7	255749,26	172778,94	6421,48
8	217653,15	148504,65	6040,25
Coefficiente de Variação	15,18	10,89	12,70
Média	268452,55	182959,23	6380,07

A dispersão das quantificações encontradas no gráfico 8 mostra uma distribuição para as concentrações de alta, média e baixa nas 8 replicadas.

Gráfico 8: Dispersão dos valores encontrados no estudo de precisão intracorrída.

No gráfico pode ser observado um nível de distribuição dos valores encontrados para cada uma das concentrações, em verde, os valores para baixa, em vermelho, os valores para média e em azul os valores para alta. No eixo Y estão as concentrações, no eixo X os valores encontrados na medição.



Três ensaios foram realizados para avaliar o grau de dispersão da precisão intercorrida. Os resultados são mostrados no quadro 10.

Quadro 10: Estudo da precisão intercorrida.

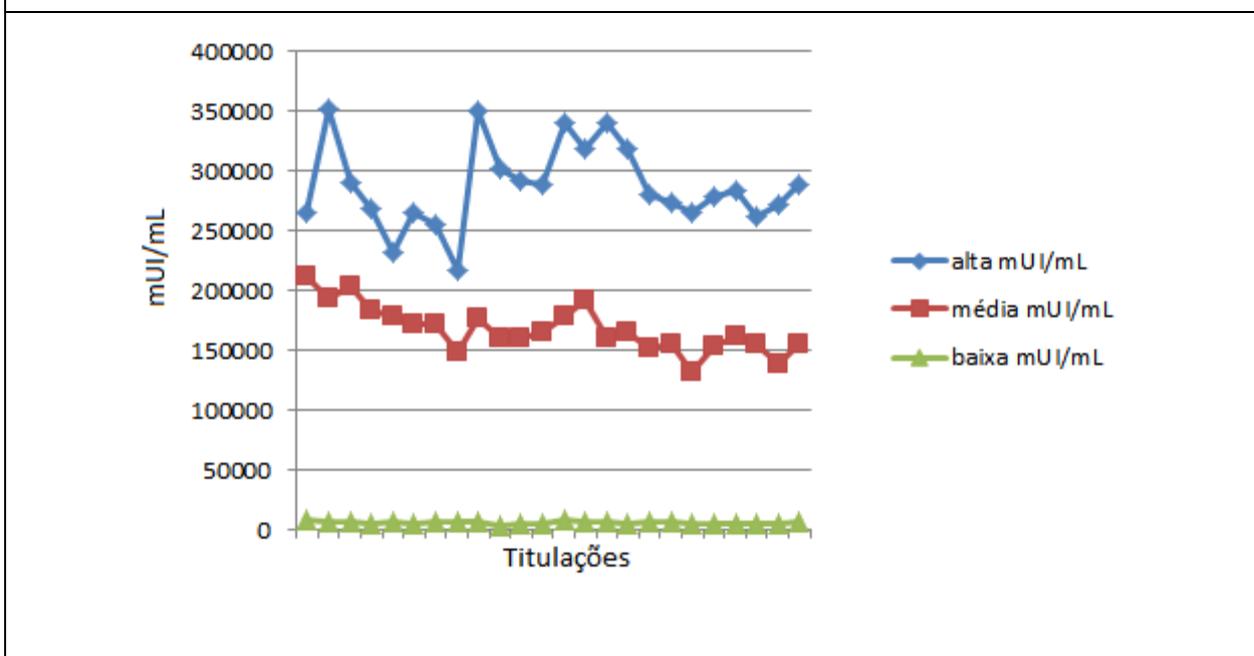
Os resultados foram expressos pelo (CV%) e também calculada a média das 8 replicadas em cada uma das concentrações alta, média e baixa em três dias distintos (6, 12 e 13 de janeiro de 2016).

	1º placa 06-01-16			2º placa 12-01-16			3º placa 13-01-16		
	Alta	Média	Baixa	Alta	Média	Baixa	Alta	Média	Baixa
Conc. mUI/mL	265011,29	211579,51	7874,09	350180,17	176677,35	6088,44	280112,68	152123,66	6059,51
	352000,76	194137,40	6913,60	301771,06	160539,42	3906,77	272928,85	155777,21	6085,88
	291123,77	202852,79	6629,66	291973,56	160153,62	5358,89	265199,42	131518,11	5041,70
	268424,72	183772,36	5900,04	288203,81	164904,95	5108,63	278842,54	153266,61	5854,04
	231520,89	178267,84	6151,63	339629,29	178369,10	8085,48	283479,91	161619,63	5205,31
	266136,56	171780,49	5109,77	318264,65	191229,28	7116,71	262147,43	155578,84	5017,54
	255749,26	172778,94	6421,48	339629,40	160154,62	7116,69	272868,78	139416,62	5989,64
	217653,15	148504,65	6040,25	318264,67	164910,95	5358,91	288236,10	155578,84	6478,84
CV (%)	15,18	10,89	12,70	7,31	6,68	22,51	3,23	6,62	9,65
Média	268452,55	182959,25	6380,06	318489,58	169617,41	6017,56	275476,97	150609,94	5716,56

O gráfico 9 apresenta a dispersão das quantificações encontradas para as 24 medições de alta, média e baixa, pois essas foram realizadas em 8 replicadas cada, realizadas em três dias distintos.

Gráfico 9: Dispersão dos valores encontrados no estudo de precisão intercorrida.

No gráfico pode ser observado um nível de distribuição dos valores encontrados para cada uma das concentrações, em verde, os valores para baixa, em vermelho, os valores para média e em azul os valores para altas concentrações. No eixo Y estão as concentrações, no eixo X os valores encontrados na medição.



A precisão foi realizada para demonstrar a proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de um único soro amostral, sendo avaliada pelo índice de CV. Os valores obtidos ficaram abaixo de 15%, refletindo um resultado excelente se comparado à citação da ANVISA para os valores de $\leq 15\%$ para as amostras de controle de qualidade (CQ) e o LIQ e $\leq 20\%$.

A avaliação da variabilidade entre os diferentes dias da análise foi realizada, neste estudo, mantendo-se o mesmo analista durante os dias de análise, independente da data do ensaio. Os resultados encontrados puderam ser reproduzidos durante a rotina.

Na segunda placa da precisão intercorrida foi observado que um valor do coeficiente de variação apresentou um resultado acima do valor especificado e, neste caso, foi considerado que houve uma interferência no momento da análise.

Isto pode ser comprovado pois os demais resultados encontrados para o estudo da precisão ficaram dentro do limite esperado. Não foi possível repetir esta segunda análise devido à falta de soro humano (matriz biológica).

5.4.4. Exatidão

O ensaio foi realizado para avaliar a exatidão intracorrida. O erro padrão relativo foi calculado a partir do título obtido de cada concentração da curva padrão, dividido pelo valor nominal de cada uma. O quadro 11 mostra os resultados finais dos cálculos realizados para a exatidão intracorrida.

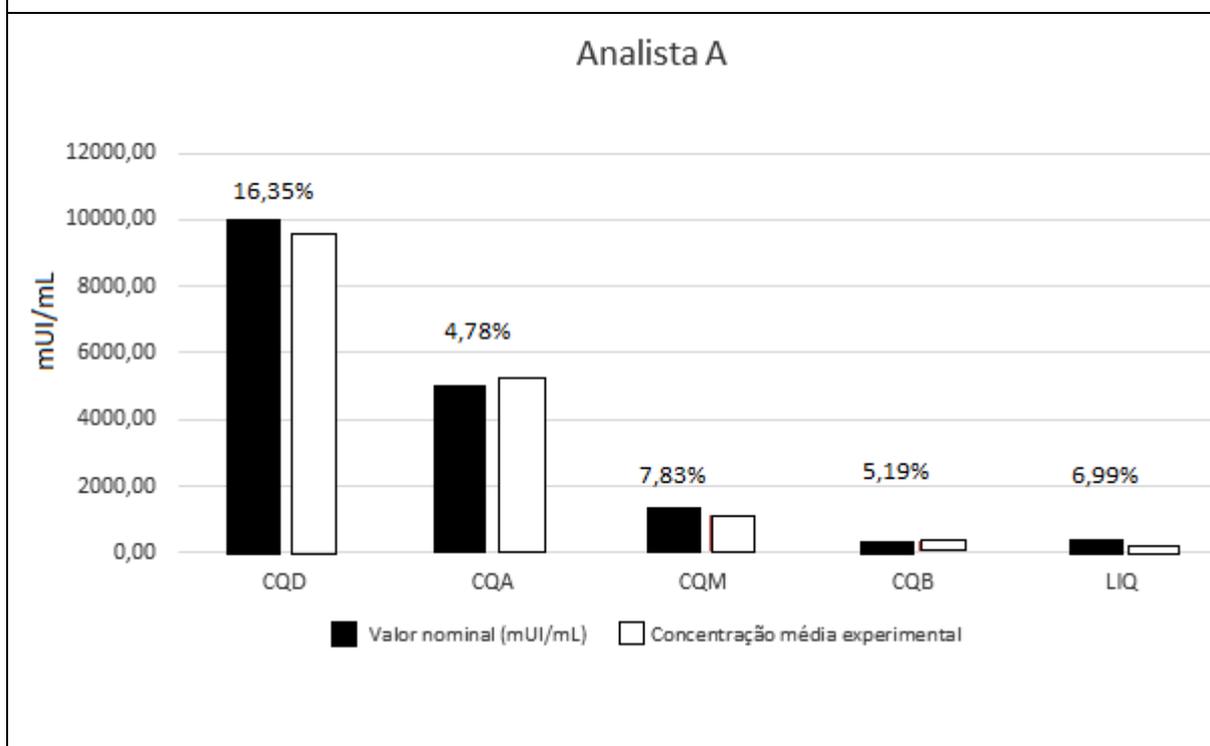
Quadro 11: Estudo da exatidão intracorrida.

Os resultados foram expressos pelo (EPR%) que considera o valor nominal em mUI/mL em relação a concentração média experimental das 6 replicadas em cada uma das concentrações para o CQD, CQA, CQM, CQB e o LIQ em um único dia e por um analista.					
Analista A					
Conc. mUI/mL	CQD	CQA	CQM	CQB	LIQ
	15975,13	10401,33	1136,05	369,24	141,71
	11092,35	11114,87	1163,06	359,54	149,48
	11179,24	9490,94	1134,72	317,89	131,59
	11880,50	10530,88	1168,73	310,66	150,59
	11095,77	11067,40	1160,87	361,04	149,68
10907,45	11835,28	1149,61	310,70	148,90	
Valor nominal (mUI/mL)	15000,00	10000,00	1250,00	321,50	156,25
Concentração média experimental	12021,74	10740,12	1152,17	338,18	145,33
EPR (%)	16,35	4,78	7,83	5,19	6,99

A comparação entre os valores da média experimental da concentração e o valor nominal foi apresentado no gráfico 10, no qual pode-se observar a existência de uma semelhança.

Gráfico 10: Comparação dos valores encontrados no estudo de exatidão intracorrida.

No gráfico da exatidão, pode ser observado um decréscimo na distribuição dos valores encontrados para cada uma das concentrações, em preto, os valores das concentrações nominais, em branco, os valores da concentração média experimental para as concentrações de CQD, CQA, CMQ, CQB e LIQ.



A exatidão, que foi avaliada pela concordância entre o resultado de um ensaio e um valor de referência, cujo erros relativos variaram em 16,35% (CQD), 4,78% (CQA), 7,83% (CQM), 5,19% (CQB) e 6,99% (LIQ), sendo que o limite recomendado de EPR pela ANVISA é de $\pm 15\%$ para as concentrações de controle de qualidade e $\pm 20\%$ para o LIQ.

5.4.5. Limite de quantificação e detecção

Os limites de quantificação e detecção são determinações descritas na RE nº 899/2003 da ANVISA e estes são estudados para conhecer a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão, no caso do limite de quantificação, e a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, no caso do limite de detecção (Brasil, 2003). Os limites foram estabelecidos por meio da análise de concentrações conhecidas e decrescentes do analito até o menor nível quantificável e detectável, sendo utilizado para a avaliação, o soro de referência NIBSC. Para o estudo, partiu-se da concentração de 625 mUI/mL. Os resultados encontrados, apresentaram como limite de quantificação o valor de 125mUI/mL, compreendido entre as concentrações de 156,25 e 78,125 mUI/mL uma vez que, dentro dessa faixa, os valores são superiores ao ponto de corte. O limite de detecção foi encontrado na concentração de 78,125 mUI/mL, pois observou-se que os resultados apresentados neste estudo mostram que, nesta concentração, alguns valores foram detectados, porém não quantificados de acordo com o ponto de corte. Isso também foi visualizado pela leve alteração de cor da placa quando a solução de ácido foi adicionada. As considerações realizadas acima estão apresentadas no quadro 12.

Quadro 12: Limite de quantificação e limite de detecção.

Os resultados foram expressos pelas análises do (CV%) nas 6 curvas de calibração dentro da faixa de 625 a 39,063 mUI/mL.					
Limite de quantificação e limite de detecção					
mUI/mL	625	312,5	156,25	78,125	39,063
Curva 1	675,80	369,24	141,71	110,94	-
Curva 2	586,25	359,54	149,48	155,75	46,50
Curva 3	596,95	317,89	131,59	114,95	41,89
Curva 4	617,76	310,66	150,59	110,28	39,52
Curva 5	585,79	361,04	149,68	70,69	46,98
Curva 6	614,66	310,70	148,90	-	-
CV %	5,50	8,22	5,14	26,78	8,28
Média	612,87	338,18	145,33	112,52	43,72

A concentração de 39,063 mUI/mL confirma que, em concentrações abaixo do valor de 78,125 mUI/mL, não há como encontrar o limite de detecção

De acordo com a RDC nº 27/2012 da ANVISA (Brasil, 2012), foi criado um compilado dos estudos realizados para a validação do método ViBI, no qual foram inseridos seus resultados. O quadro 13 sumariza os dados.

Quadro 13: Compilado dos resultados encontrados no estudo de validação.

Dados da seletividade, curva de calibração, precisão, exatidão, e dos limites quantificação e detecção do método. (CV) da precisão e (EPR) da exatidão.				
Parâmetro	Resultados em mUI/mL			Critério de Aceitação
Seletividade	Positivo			Demonstrar positividade para o soro referência para dengue sorotipos 1, 2, 3 e 4.
Curva de calibração	Concentrações	(média)	CV%	- CV ≤ 20% em relação à concentração nominal para a diluição do LIQ. - CV ≤ 15% em relação à concentração nominal para as demais diluições. - 75% das diluições aprovados de acordo com os critérios acima.
	10000			
	5000	10740,12	7,41	
	2500	5238,77	8,71	
	1250	2711,42	6,15	
	625	1152,17	1,25	
	312,5	612,87	5,50	
	156,25	338,18	8,22	
		145,33	5,14	

Precisão	Intracorrída									CV ≤ 20% para o LIQ e CV ≤ 15% para as demais concentrações
	CQD: 15,18 CQM: 10,89 CQB: 12,70									
	Intercorrída									
	CQD	CQM	CQB	CQD	CQM	CQB	CQD	CQM	CQB	
	1º placa			2º placa			3º placa			
	15,18	10,89	12,70	7,31	6,68	22,51	3,24	6,62	9,66	
Exatidão	Intracorrída									ERP ± 20% para o LIQ e ERP ± 15% para as demais concentrações
	CQD: 16,35 CQA: 4,78 CQM: 7,83 CQB: 5,19 LIQ: 6,99									
L.Qt	125 mUI/mL									À determinar
L.Dc	78,125 mUI/mL									À determinar

Os resultados da precisão intracorrída e intercorrída não apresentaram valores que ultrapassassem os 20 % determinados pela ANVISA, o que indica pouca dispersão dos títulos calculados no teste. Com relação à exatidão, foram observados valores inferiores a 20 %, significando que a diferença entre o valor nominal de cada uma das 5 concentrações definidas no teste, quando comparadas com o valor calculado, obtendo-se proximidade.

Uma das maiores dificuldades para a validação do método está na natureza da amostra, que foi soro humano (matriz biológica) que pode se comportar de forma variável, pois é composto por água, proteína, hormônios, nutrientes, gases e excreções.

É importante explicar que a validação de métodos deve ser esquematizada antes de seu desenvolvimento e execução. A estratégia de validação de um método bioanalítico é peculiar e é influenciada pelo procedimento utilizado, pela natureza e composição da matéria de interesse e pela matriz. Delineando o desenvolvimento, otimização e validação de métodos de uma maneira lógica e organizada, os laboratórios podem emitir resultados bastante eficientes e bem-sucedidos. A validação

de métodos é um processo tedioso, mas a qualidade dos resultados alcançada está diretamente atrelada com o desempenho deste processo.

O desenvolvimento de métodos alternativos tem progredido ultimamente fazendo com que o estudo sobre novas técnicas, sejam estimulados e isto vem promovendo discussões sobre a aplicação dos 3Rs (*Reduction, Replacement e Refinement* ou Redução, Reposição e Refinamento). Estas discussões vão de encontro as necessidades demandadas para avaliar a eficácia de uma vacina, como suas propriedades imunogênicas, concentração e via de administração, número de doses e seus intervalos (quando necessárias), necessidade e emprego de adjuvantes e, no caso das vacinas orais, o ambiente gastrointestinal e a forma de apresentação epitópica (Takashi et al., 2009).

Uma revisão na literatura a respeito do PRNT evidencia seu uso a partir do fim da década de 1969. Em 1981, Poland e colaboradores fizeram um estudo para quantificar anticorpos contra febre amarela em 149 militares utilizando os ensaios Teste de Proteção em Camundongos (Mouse Protection Test - MPT) e o PRNT. Os resultados demonstraram que dos 39 indivíduos que não tiveram anticorpos detectados pelo PRNT (titre <2), 38 também foram seronegativos pelo MPT. No entanto, das 48 pessoas sem anticorpos detectáveis pelo MPT, apenas 38 foram também negativos (título <2) pelo PRNT. Ou seja, mesmo que os testes tenham como base o mesmo princípio, soroneutralização, a sensibilidade pode variar, porque os resultados PRNT podem variar de acordo com a leitura do observador.

Niedrig e colaboradores avaliaram anticorpos contra febre amarela em soros de 209 voluntários e não encontraram relação sólida entre os resultados do PRNT e outros ensaios. O teste de imunofluorescência apresentou baixa sensibilidade. Apenas para valores maiores do que 1:50 foram observados aumentos nos resultados desse método. O ELISA se mostrou com alta sensibilidade, mas sem correlação com os resultados do PRNT (Niedrig et al., 1999).

Embora o PRNT seja o método padrão ouro para determinação de anticorpos neutralizantes, existem diferenças metodológicas entre os laboratórios que podem gerar um problema na reprodutibilidade do método. Devido à necessidade do uso de controles positivos e negativos para melhor controle de qualidade, tem-se padronizado o uso de unidades internacionais como unidade de medida (Niedrig et al., 1999; Grobusch et al., 2013).

6. CONCLUSÃO

A determinação da positividade do teste foi realizada pela análise das 4 curvas do padrão, assim como pela avaliação dos 30 soros amostrais e, nestas avaliações realizadas, pode-se concluir que o limite para definir a seleção de resultados positivos e negativos foi de 125 mU/mL (ponto de corte).

Ficou demonstrado que a comparação entre os métodos ViBI e PRNT foi equivalentemente aceitável, já que quando comparados soros amostrais de mesmos indivíduos, os resultados tiveram uma correlação alta de acordo com a avaliação realizada pelas ferramentas estatísticas de Spearman, Mann Whitney e Wilcoxon.

A avaliação da validade/acurácia demonstrou que os resultados para a sensibilidade de ambos os métodos foram equivalentes.

A validação do método ViBI foi realizada pelo estudo dos testes de seletividade, curva de calibração, precisão, exatidão e pelos limites de detecção e quantificação e foram encontrados resultados satisfatórios durante os cálculos, isto é, que respeitaram os critérios de aceitação da RDC nº 27/2012 e RE 899/2003, ambas da ANVISA.

Neste trabalho, demonstrou-se que o método ViBI pode ser utilizado para titulação de anticorpos IgG em indivíduos sabidamente imunizados com a vacina de Febre Amarela, porém, por ser um método alternativo e não compendial, este não pode ser inicialmente a escolha frente ao método clássico de PRNT.

Sendo assim:

- Os limites de concentração foram estabelecidos em 4 curvas de diluição do padrão, nas quais pôde-se fazer a seleção de resultados positivos e negativos e definiu-se o ponto de corte do método ViBI de 125 mU/mL, assim como a confirmação desse limite foi demonstrada pela titulação dos 30 soros amostrais de indivíduos pós-vacinados;
- Foi demonstrada uma alta correlação entre os métodos, e também não houve diferença estatisticamente significativa nos resultados obtidos em ambos os testes;
- A avaliação da validade/acurácia demonstrou resultados equivalentes para ambos os métodos;

- Foram estabelecidas as curvas de calibração para determinar as amostras de Controle de Qualidade, isto é, as amostras de CQ, a fim de submetê-las à validação;
- Os testes de validação foram realizados com resultados satisfatórios, sendo, portanto, uma evidência de que o método cumpre o requisito regulatório.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALVES, E.A.; GUIMARÃES, A.C.R. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: Histórico de desenvolvimento da tecnologia de cultura de tecidos. Cultivo de celular. - Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio; IOC, 2010; 2(5), p.215-253.

ARAUJO, T.P.; RODRIGUES, S.G.; COSTA, M.I.W.A.; VASCONCELOS, P.F.C.; ROSA, A.P.A.T. Diagnóstico sorológico de infecções por dengue e febre amarela em casos suspeitos do Estado do Pará, Brasil, 1999. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2002; 35(6), p.579-584.

BARBA-SPAETH, G.; LONGMAN, R.S.; ALBERT, M.L.; RICE, C.M. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. The Journal of Experimental Medicine, 2005; 202(9), p. 1179-1184.

BARROS, C.B. Validação de métodos analíticos. Tecnologia & Desenvolvimento. Biológico, v.64, n.2, p.175-177, São Paulo: jul./dez., 2002.

BARROS, V.E.D.; THOMAZINI, J.A.; FIGUEIREDO, L.T.M. Cytopathological changes induced by selected Brazilian flaviviruses in mouse macrophages. Journal of Microscopy, 2004; 216, p. 5-14.

BENCHIMOL, L.J. Febre amarela: a doença e a vacina, uma história inacabada. 20.ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2001. cap 3, p. 458.

BIO-MANGUINHOS. Instrução de Trabalho nº7279. Teste ViBI para dosagem de anticorpos neutralizantes anti-febre amarela. Rio de Janeiro. 2013. p.5.

BIO-MANGUINHOS. Protocolo de validação nº 7712. Validação do método ViBI para dosagem de anticorpos neutralizantes anti-febre amarela. Rio de Janeiro. 2013. p. 16.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília: Ministério da Saúde; 2003. p. 12.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância epidemiológica de eventos adversos pós-vacinação. Brasília, DF, 2008. p. 188.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Textos Básicos de Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. Brasília, DF, 2010 (a). Série B. 8.ed. p. 444.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 17, de 16 de Abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 2010 (b).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Febre amarela no Brasil: recomendações para a vigilância, prevenção e controle. Brasília, DF, 2011. p. 20.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria-Executiva. Subsecretaria de Planejamento e Orçamento. Textos Básicos de Saúde. Plano Nacional de Saúde 2012-2015. Brasília, DF, 2011. Série B. p. 114.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Brasília, DF, 2012. p. 11.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Brasília, DF, 2014. volume 45. nº 07.

CAMARGO, I.F.; GASPAR, A.M.C.; YOSHIDA, C.F.T. Comparative ELISA reagents for detection of hepatitis B surface antigen (HBsAg). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1987; 82(2), p. 181-187.

CAMPI-AZEVEDO, A.C.; ARAUJO-PORTO, L.P.; SILVA, M.L.; BATISTA, M.A.; MARTINS, M.A.; AVELAR, R.S.; LEMOS, D.S.; CAMACHO, L.A.B.; MARTINS, R.M.; MAIA, M.L.S.; FARIAS, R. H.G.; FREIRE, M.S.; GALLER, R.; HOMMA, A.; RIBEIRO, J.G.I.; LEMOS, J.A.C.; MARTINS, M.A.; CALDAS, I.R.; ELÓI-SANTOS, S.M.; CARVALHO, A.T.; MARTINS-FILHO, O.A. 17DD and 17D-213/77 yellow fever substrains trigger a balanced cytokine profile in primary vaccinated children. *PLoS ONE*, 2012; 7(12):e49828.

CAZARIN, K.C.C.; CORRÊA, C.L.; ZAMBRONE, F.A.D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 2004; 40(3), p. 289-299.

FERREIRA, V.K.; ROCHA, C.K.; CAPUTTOL, Z.L.; FONSECA, A. L.A.; FONSECA, A.L.F. Histórico da febre amarela no Brasil e a importância da vacinação anti-amarela. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde*, 2011; 36(1), p. 40-47.

FIGUEIREDO, L.T.M. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2006; 39(2), p. 203-210.

FREIRE, M.S.; MANN, G.F.; MARCHEVSKY, R.S.; YAMAMURA, A.M.; ALMEIDA, L.F.; JABOR, A.V.; MALACHIAS, J.M.; COUTINHO, E.S.F.; GALLER, R. Production of yellow fever 17DD vaccine virus in primary culture of chicken embryo fibroblasts: yields, thermo and genetic stability, attenuation and immunogenicity. *Vaccine*, 2005; 23, p. 2501-2512.

GAUCHER, D.; THERRIEN, R.; KETTAF, N.; ANGERMANN, B.R.; BOUCHER, G.; FILALI-MOUHIM, A. et al. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and

polyfunctional immune responses. *The Journal of experimental medicine*, 2008; 205 (13), p. 3119-3131.

GOTUZZO, E.; YACTAYO, S.; CORDOVA, E. Efficacy and duration of immunity after yellow fever vaccination: systematic review on the need for a booster every 10 years. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2013; 89 (3), p. 434-444.

GROBUSCH, M.P.; GOORHUIS, A.; WIETEN, R.W.; VERBERK, J.D.; JONKER, E.F.; VAN GENDEREN, P.J. et al. Yellow fever revaccination guidelines change - a decision too feverish? *Clinical Microbiology and Infection*, 2013; 19 (10), p.885-886.

HATANAKA, V.M.A; BENSEÑOR, I.M. Avaliação de testes diagnósticos. In "Epidemiologia. Abordagem Prática". Sarvier, 1ª Edição, 2005.

HENDRIKSEN, C.; SPIESER, J.M.; AKKERMANS, A.; BALLS, M.; BRUCKNER, L.; CUSSLER, K.; DAAS, A.; DESCAMPS, J.; DOBBELAER, R.; FENTEM, J.; HALDER, M.; VAN DER KAMP, M.; LUCKEN, R.; MILSTIEN, J.; SESARDIC, D.; STRAUGHAN, D.; VALADARES, A. Validation of alternative methods for the potency testing of vaccines. *ECVAM Workshop Report 31. Alternatives to Laboratory Animals*, 1998; 26, p.747-761.

HOKAMA, D. A. Avaliação das melhorias no sistema de controle de qualidade de vacinas em Bio-Manguinhos. Período 1999-2004. 2005. 87 f. Dissertação (Biologia Celular e Molecular). Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

JONKER, E.F.; VISSER, L.G.; ROUKENS, A.H. Advances and controversies in yellow fever vaccination. *The Advance Vaccines*, 2013; 1(4), p.144-152.

KLAUS, D.G.; SASSI, G.; MARASCA, F.A.; FRANCESCHI, W.B. Doença viscerotrópica aguda por vacina da febre amarela. *Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul*, 2010; 54(4), p. 443-448.

LIPRAND, F.; WALDER, R. Replication of virulent and attenuated strains of yellow fever virus in human monocytes and macrophage-like cells (U937). *Archives of Virology*, 1983; 76, p. 51-61.

MAEDA, A.; MAEDA, J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *Veterinary Journal*, 2013; 195, p. 33-40.

MARIANNEAU, P.; STEFFAN, A-M.; ROYER, C.; DROUET, M.T.; JAECK, D.; KIRN, A. et al. Infection of primary cultures of human Kupffer cells by dengue virus: no viral progeny synthesis, but cytokine production is evident. *Journal Virology*, 1999; 73, p. 5201-5206.

MARTINS, M.A.; SILVA, M.L.; ELOI-SANTOS, S.M.; RIBEIRO, J.G.L.; PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; MARCIANO, A.P.; HOMMA, A.; KROON, E.G.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A. Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination. *Vaccine*, 2008; 26(9), p. 1173-1184.

MARTINS, M.A.; SILVA, M.L.; MARCIANO, A.P.; PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; ELOI-SANTOS, S.M.; RIBEIRO, J.G.L.; HOMMA, A.; KROON, E.G.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A. Activation/modulation of adaptive immunity emerges simultaneously after 17DD yellow fever first-time vaccination: is this the key to prevent severe adverse reactions following immunization? *Clinical and Experimental Immunology*, 2007; 148(1), p. 90-100.

MATOS, D.C.S.; MARCOVISTZ, R.; CABELLO, P.H.; GEORGINI, R.A.; SAKAUCHI, D.; SILVA, L.L. Immunogenicity test of tetanus component in adsorbed vaccines by toxin binding inhibition test. *Instituto Oswaldo Cruz*, 2002; 97(6), p. 909-913.

MONATH, T.P. 17D yellow fever virus vaccine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2013; 89(6), p.1226-1227.

MONATH, T.P. Yellow fever vaccine. Review. *Expert Review Vaccines*, 2005; 4(4), p.1-22.

MONATH, T.P.; FOWLER, E.; JOHNSON, T.C.; BALSER, J.; MORIN, J.M.; SISTI, M.; TRENT, W.D. An inactivated cell-culture vaccine against yellow fever. *The New England and Journal of Medicine*, 2011; 364(14), p. 1326-1333.

MONATH, T.P.; NYSTROM, R.R. Detection of yellow fever virus in serum by enzyme immunoassay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1984a.b; 33(1), p.151-157.

MOURA, W.C. Aplicação do conceito dos três Rs nos ensaios de controle da qualidade de imunobiológicos para raiva. 2009. 119 f. Tese (Vigilância Sanitária). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

NAKANE, P.K.; KAWAOI, A. Peroxidase labeled antibody, a new method of conjugation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*; 1974; 22, p.1084-1091.

NEVES, P.C.; MATOS, D.C.; MARCOVISTZ, R.; GALLER, R. TLR expression and NK cell activation after human yellow fever vaccination. *Vaccine*, 2009; 27(41), p. 5543-549.

NEVES, P.C.C. Estudo da resposta imunológica contra o vírus vacinal YF 17DD e seus derivados recombinantes YF 17D/ SIV após a imunização de modelos experimentais. 2013. 203 f. Tese (Biologia Celular e Molecular). Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

NIEDRIG, M.; LADEMANN, M.; EMMERICH, P.; LAFRENZ, M. Assessment of IgG antibodies against yellow fever virus after vaccination with 17D by different assays: neutralization test, haemagglutination inhibition test, immunofluorescence assay and ELISA. *Tropical medicine & International Health: TM & IH*, 1999; 4(12), p. 867-871.

NÓBREGA, A.A.; TEIXEIRA, A.M.S.; LANZIERI, T.M. Avaliação do sistema de informação do programa de imunizações (SI-API). Caderno de Saúde Coletiva, 2010;18(1), p. 145-153.

OLIVEIRA, V.A.C.; MOTA, H.L.M.; NETO, S.L.L.; TAUIL, L.P. O que o reumatologista deve saber sobre a vacina contra febre amarela. Revista Brasileira de Reumatologia, 2013; 53(2), p. 206-210.

PALMER, D.R.; FERNANDEZ, S.; BISBING, J.; PEACHMAN, K.K.; RAO, M. BARVIR, D. et al. Restricted replication and lysosomal trafficking of yellow fever 17D vaccine virus in human dendritic cells. Journal of General Virology, 2007; 88(Pt 1), p. 148-156.

POLAND, J.D.; CALISHER, C.H.; MONATH, T.P.; DOWNS, W.G.; MURPHY, K. Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. Bulletin of the World Health Organization, 1981; 59(6), p. 895-900.

PONTE, C.F. Vacinação, controle de qualidade e produção de vacinas no Brasil a partir de 1960. História, Ciências, Saúde, 2003; 10(2), p. 619-653.

POSSAS, J.L.S. Aplicação do conceito do erro total, dos perfis de exatidão e dos índices de exatidão na validação em uso de um imunoensaio para detecção de ovoalbumina em vacina contra febre amarela. 2014. 93 f. Dissertação (Controle de Qualidade em Saúde). Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro.

PULENDRAN, B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. Nature Reviews Immunology, 2009; 9(10), p. 741-747.

QUEREC, T.; BENNOUNA, S.; ALKAN, S.; LAOUAR, Y.; GORDEN, K.; FLAVELL, R. et al. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. Journal Experimental Medicine, 2006; 203(2), p. 413-424.

QUEREC, T.D.; PULENDRAN, B. Understanding the role of innate immunity in the mechanism of action of the live attenuated Yellow Fever Vaccine 17D. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2007; 590, p. 43-53.

REISDÖRFER, F.C. Estudo visando à extensão do prazo de validade da vacina febre amarela (atenuada) 05 e 10 doses. 2011. 112 f. Dissertação (Tecnologia de Imunobiológicos). Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

ROBERTSON, S.E.; HULL, B.P.; TOMORI, O.; BELE, O.; LEDUC, J.W.; ESTEVES, K. Yellow Fever. A decade of reemergence. *Journal of the American Medical Association*, 1996; 276, p. 1157-1162.

ROCA, M.F.; SOBRINHO, J.L.S.; NUNES, C.C.; NETO, P.J.R. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. *Revista Brasileira de Farmácia*, 2007; 88(4), p. 177-180.

ROMANOS, M.T.V. Febre amarela e dengue. In: Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. *Introdução à virologia humana*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2008. p. 399-408.

SANTANA, M.G.V.; NEVES, P.C.C.; SANTOS, J.R.; LIMA, N.S.; SANTOS, A.A.C.; WATKINS, D.I.; GALLER, R.; BONALDO, M.C. Improved genetic stability of recombinant yellow fever 17D virus expressing a lentiviral Gag gene fragment. *Elsevier;Virology*, 2014; 452-453, p. 202-211.

SANTOS, A.P.; MATOS, D.C.; BERTHO, A.L.; MENDONÇA, S.C.; MARCOVISTZ, R. Detection of Th1/Th2 cytokine signatures in yellow fever 17DD first-time vaccines through ELISpot assay. *Cytokine*, 2008; 42(2), p. 152-155.

SAWYER, W.A.; LLOYD, W. The use of mice in tests of immunity against yellow fever. *Journal Experimental Medicine*, 1931; 54(4), p. 533-555.

SCHLESINGER, J.J.; BRANDRISS, M.W.; MONATH, T.P. Monoclonal antibodies distinguish between wild and vaccine strains of yellow fever virus by neutralization, hemagglutination inhibition, and immune precipitation of the virus envelope protein. *Virology*, 1983; 125, p. 8-17.

SEADI, C.C. Princípios básicos de imunologia. 1ª ed. Rio Grande do Sul: Editora da ULBRA, 1998. p. 248.

SILVA, F.M. Desenvolvimento de um teste imunoenzimático (ELISA) para a detecção do antígeno do vírus da FA (17DD) inativado. 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos). Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

SILVA, M.L. Padrão de Citocinas intracelulares em leucócitos circulantes de voluntários primovacinação com a vacina 17DD contra a febre amarela. 2005. 105 f. Dissertação. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SILVA, M. L. Caracterização da resposta vacinal antiamarílica em crianças e adultos, utilizando o modelo panorâmico de análise imunofenotípica. 2011. 89 f. Tese de Doutorado. Centro de Pesquisa René Rachou. Fundação Oswaldo Cruz. Belo Horizonte.

SILVA, M.L.; MARTINS, M.A.; ESPIRITO-SANTO, L.R.; CAMPI-AZEVEDO, A.C.; SILVEIRA-LEMOES, D.; RIBEIRO, J.G, et al. Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. *Vaccine*, 2011; 29(3), p. 583-592.

SILVA, N.R.J. Avaliação da interferência da vacinação contra febre amarela na vacinação contra rubéola. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Saúde Pública.). Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

SIMÕES, M. Avaliação da acurácia e confiabilidade do teste sorológico de neutralização por redução de placas de lise (*micro PRNT*) na detecção de anticorpos para o vírus da Febre Amarela. 2011. 101 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos). Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

SIMÕES, M.; CAMACHO, L.A.B.; YAMAMURA, A.M.Y.; MIRANDA, E.H.; CAJARAVILLE, A.C.R.A. FREIRE, M.S. Evaluation of accuracy and reliability of the plaque reduction neutralization test (*micro-PRNT*) in detection of yellow fever virus antibodies. *Biologicals*, 2012; 40, p. 399-404.

STOCK, N.K.; BOSCHETTI, N.; HERZOG, C.; APPELHANS, M.S.; NIEDRIG, M. The phylogeny of yellow fever virus 17D vaccines. *Vaccine*, 2012; 1(30), p. 989-994.

STEINMAN, R.M.; BANCHEREAU, J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*, 2007; 449, p. 419-426.

STEPHENS, P.R.S.; OLIVEIRA, M.B.S.C.; RIBEIRO, F.C.; CARNEIRO, L.A.D. *Virologia. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde*. Rio de Janeiro: EPSJV, 2009. v.4. cap 2. p. 126-220.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Recognition of viruses by innate immunity. *Immunological Reviews*, 2007; 220, p. 214-224.

TOLEDO, L.G.; OVALLE, I.I. *Estatística Básica*. 1ª ed. São Paulo: Atlas, 1995. p.464.

VASCONCELOS, P.F. Yellow Fever. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2003; 36(2), p. 275-293.

VASCONCELOS, P.F.C. Febre amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 2002; 5(3), p. 244-258.

WALDMAN, A.E.; LUHM, R.K.; MONTEIRO, G.M.A.S.; FREITAS, M.R.F. Surveillance of adverse effects following vaccination and safety of immunization programs. *Revista de Saúde Pública*, 2011; 45(1), p. 173-184.

WHO, Pan American Health Organization Control of Yellow Fever: Field Guide, Scientific and Technical Publication, 2005; p. 603.

WRAMMERT, J.; MILLER, J.; AKONDY, R.; AHMED, R. Human immune memory to yellow fever and smallpox vaccination. *Journal of Clinical Immunology*, 2009; 29(2), p. 151-157.

Sites consultados:

<http://www.libertaria.pro.br/d_ressurgentes_intro.htm> acessado em 10/06/2014.

Ministério da Saúde, Programa Nacional de Imunização. Disponível em <http://pni.datasus.gov.br/download_sh_Febre_Amarela_2009.asp> acessado em 16/07/2014.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Disponível <<http://eapv.com.br/eapv/conduas/1-1-8-eventos-adversos-pos-vacinacao-contrafebre-amarela/>> acessado em 17/08/2014.