

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS – FARMANGUINHOS

Victor de Oliveira Silva Ferreira

**Avaliação da incerteza da medição do teste de neutralização por
redução de placa de lise (PRNT) de Febre Amarela**

Rio de Janeiro

2018

Victor de Oliveira Silva Ferreira

Avaliação da incerteza da medição do teste de neutralização por redução de placa de lise (PRNT) de Febre Amarela

Dissertação submetida ao corpo docente do Curso de Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadoras: Prof.^a Dr.^a Erika Martins Carvalho

2º Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sheila Maria Barbosa

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE

F383a

Avaliação da incerteza da medição do teste de neutralização por redução de placa de lise (PRNT) de Febre Amarela. / Victor de Oliveira Silva Ferreira. – Rio de Janeiro, 2018.

xx, 82 f. : il. ; 30 cm.

Orientadores: Erika Martins Carvalho e Sheila Maria Barbosa.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos-Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2018.

Bibliografia: f. 70-75

1. Febre Amarela. 2. Imunogenicidade. 3. Anticorpos Neutralizantes. 4. Zona Cinza. 5. Incerteza de Medição. I. Título.

CDD 615.1

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese/dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Victor de Oliveira Silva Ferreira

Avaliação da incerteza da medição do teste de neutralização por redução de placa de lise (PRNT) de 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 07 de março de 2018.

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Erika Martins de Carvalho
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ (orientadora)

Prof^ª. Dr^ª. Sheila Maria Barbosa
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – FIOCRUZ (2^o orientadora)

Prof. Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ

Prof. Dr. Rodrigo Borges de Oliveira
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO

Prof^ª. Dr^ª. Waleska Dias Schwarcz
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

A Deus, aos meus pais e irmãos. São o
motivo e a motivação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus, sem Ele nada disso seria possível. Apenas Ele e amigos mais chegados sabem o que representou na minha vida passar no mestrado e não foi sobre ter um título ou retorno financeiro. Foi a possibilidade de sonhar, de estabelecer uma visão a médio prazo e construir.

Foram dois anos difíceis: confrontos, frustrações, alegrias e novas amizades. Acima de tudo, foi sobre embarcar numa grande viagem onde o destino certamente não foi a zona de conforto, foi uma zona de incerteza.

Quero agradecer ao meu núcleo familiar: a base, o chão onde lanço os alicerces, onde estabeleço minha raiz e frutifico. Jorge Mozart, Dona Ione, Vagner, Isabela e Davi. É tudo por vocês e para vocês. Sempre foi e sempre será. A todos da minha família, vocês vencem comigo.

Minha equipe, família SEVAN: Comprometimento é o nosso nome. Companheirismo, cumplicidade, respeito profissional e pessoal alinhado com muito trabalho. Nominalmente agradeço a Ester, pois desde que me contratou, viu em mim potencial e acreditou no meu trabalho. Você é parte disso. A toda equipe muito obrigado, vocês são uma parte muito importante do meu dia e do meu riso (e eu o de vocês).

As minhas orientadoras Erika Martins Carvalho e Sheila Maria Barbosa. Se eu chorei ou se eu sumi, o importante é que emoções eu vivi. Agradeço a paciência, a confiança, a preocupação. Alinhar validação, metrologia, incerteza, Febre Amarela, micro-PRNT e se alinhar como aluno, ser humano e indivíduo não foi uma tarefa fácil. Muito obrigado por tudo.

Maria Denise você foi parte fundamental deste trabalho. Você é um ser humano lindo, presente, ajudador, que se doa, que participou de várias discussões sobre como a metrologia poderia ser aplicada aos ensaios biológicos. Me deu apoio em momentos em que me senti perdido. Trouxe luz.

A equipe do LATEV: Marisol, Emily, Stephanie, Torres e Vanessa. Foi um tempo de muito aprendizado. Muito mesmo. Foi tudo muito novo. Foi difícil, foi divertido. Agradeço a disposição de cada um de vocês em me ajudar até os momentos finais para que a apresentação ficasse perfeita.

Marisol, não esquecerei o dia em que te encontrei na biblioteca e você me perguntou se você podia me dar um abraço de boa sorte. De cara aceitei e foi um dos abraços mais sinceros, reconfortantes e motivadores que recebi.

Quero agradecer a Eduardo, pois tem sido muito presente na minha vida nesses últimos oito meses. Sempre me mostrando que a vida é surpreendente, que existe o outro lado: o lado do outro. Aquele que muitas das vezes na vida acadêmica não enxergamos, nos esquecemos, pois estamos focados em um projeto que por mais desafiador e instigante que seja, ele não nos define.

Vou viver e não vou ver tudo, mas por tudo que vi e vivi nesses últimos, valeu muito a pena. “Viver é melhor do que sonhar”.

A simplicidade é o último estágio da
sofisticação.

(LEONARDO DA VINC.)

RESUMO

FERREIRA, Victor de Oliveira Silva. *Avaliação da incerteza da medição do teste de neutralização por redução de placa de lise (PRNT) de Febre Amarela*. 2018. 98. Dissertação Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

O ensaio de neutralização por redução de placas de lise em 96 orifícios (micro-PRNT) para o vírus de Febre Amarela é o método preconizado para a avaliação da resposta imune protetora após a vacinação, onde os seus resultados numéricos são classificados em negativos ou positivos, se estiverem abaixo ou acima da linha de corte de 794 mUI/mL, onde valores numéricos iguais ou próximos a linha de corte têm uma grande chance significativa de serem inconclusivos, este intervalo de incerteza é designado como "zona cinza". Neste trabalho, a incerteza foi determinada de maneira metrologicamente consistente para classificar os resultados como negativos, indeterminados ou positivos. Foram avaliados dados obtidos na validação, da calibração do soro *in-house* contra o soro de referência internacional e de outros estudos. A incerteza expandida, com um fator de abrangência de 95,45%, do ensaio micro-PRNT foi de $\pm 0,41 \log_{10}$ mUI/mL, onde foram considerados os maiores componentes avaliados. Considerando a linha de corte de $2,90 \log_{10}$ mUI/mL, a zona cinza foi delimitada entre $2,49 \log_{10}$ mUI/mL a $3,31 \log_{10}$ mUI/mL, equivalente a 309,03 mUI/mL a 2041,74 mUI/mL. A partir deste delimitamento, um algoritmo decisório foi ilustrado por meio de um fluxograma em que, para os resultados com valores compreendidos dentro da zona cinza, é indicada a realização de três novos ensaios e caso, pelo menos dois apontarem resultados com a mesma classificação, o indivíduo deverá ser revacinado ou não. Obtendo-se como principal benefício, a segurança quanto à decisão de revacinação e uma avaliação mais criteriosa dos soros analisados.

Palavras-chave: Febre Amarela. Imunogenicidade. Anticorpos neutralizantes. Zona Cinza. Incerteza de medição.

ABSTRACT

The neutralization test for reduction of lysis in 96 wells is the reference method for the evaluation of the protective immune response after vaccination and their numerical results are classified according to cutoff of 794 mIU/mL as positive or negative. Numerical values equal or close to the cutoff have a significant chance to be inconclusive and this interval of uncertain results is designated “gray zone”. In this work, the uncertainty of measurement was determined metrologically to classify the results as negative, indeterminate or positive. Datas obtained from validation studys, characterization of anti-yellow fever in-house reference serum calibrated and standardized against an international reference serum used in study of immunogenicity assessment for vaccines and other studies were evaluated. The expanded uncertainty for a coverage probability 95,45%, was $\pm 0.41 \log_{10}$ mIU/mL, the worst case components evaluated were combined. Considering the cutoff 2,90 \log_{10} mIU/mL, the gray zone was delineated between 2.49 \log_{10} mIU/mL and 3.31 \log_{10} mIU/mL, equivalent to 309.03 mIU/mL at 2041.74 mIU/mL. From this numerical interval, a decision algorithm was illustrated by a flowchart in which, for the results with values comprised within the gray zone, three new tests are indicated and if at least two indicate results with the same classification, the individual should be revaccinated or not. The main benefit is the safety of the revaccination decision and a more careful evaluation of the analyzed serum.

Key-words: 1. Yellow Fever 2. Immunogenicity. 3. Neutralization antibody. 4. Gray zone 5. Uncertainty of measurement

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida de Flavivírus	5
Figura 2 - Formação de plaques de lise em cultura celular <i>in vitro</i>	6
Figura 3 - Esquema de diluição seriada em uma placa de 96 orifícios	12
Figura 4 - Princípio do teste de neutralização	14
Figura 5 - Desenho da placa do ensaio micro-PRNT	15
Figura 6 - Hierarquia metrológica	22
Figura 7 - Esquemática da lei da propagação de incerteza.....	26
Figura 8 - Abordagem <i>bottom-up</i>	26
Figura 9 - Abordagem top-down.....	27
Figura 10 - Diagrama de Causa e Efeito	37
Figura 11 - Diagrama de causa-e-efeito para o teste de precisão	38
Figura 12 - Diagrama de causa-e-efeito para o teste de exatidão.....	39
Figura 13 - Diagrama de causa-e-efeito para o teste de seletividade	42
Figura 14 - Diagrama de causa-e-efeito para o teste de robustez	43
Figura 15 - Cálculos para determinação de anticorpos neutralizantes.....	45
Figura 16 - Rastreabilidade das medições de concentração de anticorpos neutralizantes anti-FA	46
Figura 17 - Fluxograma do Processo de Medição do teste micro-PRNT	48
Figura 18 - Diagrama de causa-e-efeito para as etapas críticas	49
Figura 19 - Diagrama de causa-e-efeito fontes de incerteza da metodologia	51
Figura 20 - Diagrama de causa-e-efeito para os dados de validação	52
Figura 21 - Diagrama de causa e efeito para determinação da concentração de anticorpos neutralizantes em mUI/mL	55
Figura 22 - Diagrama de causa e efeito para determinação da concentração de anticorpos neutralizantes em mUI/mL – eliminando fontes de variação duplicadas..	56
Figura 23 - Algoritmo decisório baseado na zona cinza.....	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Biometrologia	18
Quadro 2 - Medições em biotecnologia.....	20
Quadro 3 - Diferentes abordagens para estimar incerteza de medição	25
Quadro 4 - Estudos avaliados para estimativa da incerteza	36
Quadro 5 - Rastreabilidade das etapas do micro-PRNT em função do modelo matemático.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições estabelecidas para o método modificado para avaliar a Robustez	44
Tabela 2 - Incerteza Teste de Precisão – \log_{10} mUI/mL.....	53
Tabela 3 - Incerteza exatidão $\log 10$ mU/mL.....	54
Tabela 4 - Incerteza tipo A	57
Tabela 5 - Incerteza atribuída ao valor do soro de referência	59
Tabela 6 - Incerteza soro <i>in-house</i>	60
Tabela 7 - Incerteza combinada do Teste de Exatidão	61
Tabela 8 - Teste de robustez.....	62
Tabela 9 - Delineamento de zona cinza em \log_{10} mUI/mL para diferentes níveis de probabilidade em.....	65
Tabela 10 - Delineamento de zona cinza em mUI/mL para diferentes níveis de probabilidade em.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAWG	- <i>Working group on bioassay</i>
BIA	- <i>BioIndustry Association</i>
Bio-Manguinhos	- Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
BIPM	- Bureau Internacional de Pesos Medidas
CAWG	- <i>Working group on cell analysis</i>
CCQM	- <i>Consultative Committee for Amount of Substance: Metrology in Chemistry and Biology</i>
CITAC	- <i>Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry</i>
CMC	- Carboximetilcelulose
Co-NANOMET	- <i>Co-Ordination of Nanometrology in Europe</i>
CONMETRO	- Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
DEGAQ	- Departamento de Garantia da Qualidade
DNA	- Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
ELISA	- <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EP50	- <i>Endpoint</i> com percentual de redução da infecciosidade viral total de 50%
FA	- Febre Amarela
Fiocruz	- Fundação Oswaldo Cruz
GUM	- Avaliação de dados de medição: guia para expressão da incerteza de medição
INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
Ipem-SP	- Instituto de Pesos e Medidas do estado de São Paulo
LAMEV	- Laboratório de Metrologia e Validação
LATEV	- Laboratório de Tecnologia Viroológica
micro-PRNT	- Teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise para Febre Amarela em Placas de 96 Orifícios
micro-RNA	- micro ácido nucleico
MMC	- Método de Monte Carlo
mRNA	- Ácido ribonucleico mensageiro
NAWG	- <i>Working group on nucleic acid analysis</i>

NIBSC	- <i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
NIST	- <i>National Institute of Standards and Technology</i>
OMS	- Organização Mundial da Saúde
OPAS	- Organização Pan-Americana da Saúde
P&D	- Pesquisa e Desenvolvimento
PAWG	- <i>Working group on protein analysis</i>
PFU	- Unidade formadora de plaques
PRNT	- Teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise (do inglês <i>Plaque Reduction Neutralization Test</i>)
PRNT ₅₀	- Teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise baseado no EP50
QbD	- <i>Quality-by-Design</i>
QUAM	- <i>Eurachem/CITAC Guide Quantifying Uncertainty In Analytical Measurement Third Edition</i>
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	- Ácido ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>)
SEVAN	- Seção de Validação Analítica
SPF	- <i>Specific Pathogen Free</i>
USP	- <i>United States Pharmacopeia</i>
VAM	- <i>Validation Analytical Measurement</i>
VDTEC	- Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico
WHO	- <i>World Health Organization</i>
YF	- <i>Yellow Fever</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

Y	- Mensurando ou grandeza de saída
X_n	- Grandeza de entrada
u	- Incerteza
u_a	- Incerteza tipo A
u_b	- Incerteza tipo B
u_c	- Incerteza combinada
mUI/mL	- Miliunidades internacionais por mililitro
S	- Desvio padrão amostral
n	- Número de repetições
$\sum C$	- Somatório de contagens
u_{pipeta}	- Incerteza da micropipeta
u_{erro}	- Incerteza do erro não corrigido
V_x	- Volume x dispensado
u_{Vx}	- Incerteza relativa do volume
a	- Volume do de soro
b	- Volume de meio PRNT
$\left(\frac{df}{dx_i}\right)$	- Derivada parcial da função f em função x , que é coeficiente de sensibilidade
v_{eff}	- Grau de liberdade efetivo
v_i	- Grau de liberdade associado a um componente de incerteza. Para v lê-se “nu”
k	- Fator de abrangência
U	- Incerteza expandida
u_E	- Incerteza da exatidão
u_{p1}	- Incerteza da precisão intracorrida
u_{p2}	- Incerteza da precisão intercorrida
T_a	- Título do soro amostral no <i>endpoint</i> 50
T_{cp}	- Título do controle positivo no <i>endpoint</i> 50
$C_{mUI/mL}$	- Título do soro de referência em mUI/mL

ln - Logaritmo natural

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1	FEBRE AMARELA.....	2
2.1.1	Um novo velho problema.....	2
2.1.2	O vírus	4
2.1.3	A vacina.....	7
2.1.4	Monitoramento da resposta imune	8
2.1.5	Ensaio biológicos	10
2.1.6	Níveis de anticorpos neutralizantes.....	11
2.1.7	Teste de neutralização por redução de placas de lise para placa de lise (PRNT) 13	
2.2	METROLOGIA.....	16
2.2.1	Unidade e Grandeza.....	19
2.2.2	Mensurando.....	19
2.2.3	Incerteza de medição	20
2.2.4	Rastreabilidade.....	21
2.3	AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO	24
2.3.1	Abordagens para a avaliação de incerteza.....	24
3	JUSTIFICATIVA.....	29
4	OBJETIVOS	30
4.1	OBJETIVO GERAL.....	30
4.1.1	Objetivos Específicos	30
5	MATERIAL E MÉTODO	31
5.1	TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO POR MEIO DA REDUÇÃO DE PLACAS DE LISE PARA FEBRE AMARELA EM PLACAS DE 96 ORÍFÍCIOS.....	31
5.1.1	Descrição da metodologia	31
5.1.2	Instrumentos/Equipamentos utilizados no ensaio.....	32
5.1.3	Materiais utilizados nos ensaios	33
5.1.4	Soros amostrais.....	33
5.1.5	Soros padrão internos (controles positivos e negativos)	34
5.1.6	Vírus	34

5.1.7	Cultura de células	34
5.2	AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO DO TESTE MICRO-PRNT	35
5.2.1	Etapa 1 - Definição do mensurando	36
5.2.2	Etapa 2 - Identificação das fontes de incerteza	36
5.2.3	Etapa 3 – Quantificação das fontes de incerteza	37
5.2.3.2.1	- A AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DA CALIBRAÇÃO DO SORO <i>IN-HOUSE</i> (<i>ue3</i>).....	39
5.2.4	Etapa 4 – Determinação da incerteza combinada e expandida.....	44
5.3	DETERMINANDO A ZONA CINZA DO ENSAIO: AVALIAÇÃO DA INCERTEZA NA LINHA DE CORTE	44
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
6.1	ETAPA 1 - DEFINIÇÃO DO MENSURANDO	45
6.2	ETAPA 2 - IDENTIFICAÇÃO DAS FONTES DE INCERTEZA.....	47
6.3	ETAPA 3 - QUANTIFICAÇÃO DAS FONTES DE INCERTEZA	52
6.3.1	Incerteza obtida no teste de precisão (precisão intracorrida e precisão intercorrida)	52
6.3.2	Incerteza obtida no teste de exatidão	54
6.3.3	Incerteza associada ao teste de robustez	62
6.3.4	Incerteza associada ao teste de seletividade.	62
6.4	ETAPA – 4 DETERMINAÇÃO DA INCERTEZA COMBINADA E EXPANDIDA 63	
6.5	DETERMINANDO A ZONA CINZA DO ENSAIO: AVALIAÇÃO DA INCERTEZA NA LINHA DE CORTE	64
7	CONCLUSÃO.....	68
8	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	69
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
	APENDICE A – VALOR DE K EM FUNÇÃO PARA V GRAUS DE LIBERDADE ...	76
	APENDICE B – ENSAIO DE CARACTERIZAÇÃO DO SORO <i>IN-HOUSE</i> DIA 1 ...	77
	APENDICE C – ENSAIO DE CARACTERIZAÇÃO DO SORO <i>IN-HOUSE</i> DIA 2 ...	78
	APENDICE D– ENSAIO DE CARACTERIZAÇÃO DO SORO <i>IN-HOUSE</i> DIA 3	79
	APÊNDICE E – RESULTADOS DO TESTE DE PRECISÃO INTRACORRIDA LOG 10 MUI/ML.....	80
	APÊNDICE F – RESULTADOS DA INCERTEZA POR SORO	81

**ANEXO A – DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE FEBRE AMARELA NOTIFICADOS:
1º/7/2017 A 16/02/2018.....82**

1 INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da biotecnologia em saúde humana e a necessidade contínua de inovação, tornou-se necessário o desenvolvimento e aprimoramento de métodos validados de acordo com os requisitos regulatórios para a quantificação de bioprodutos visando garantir o caráter principal da inovação na saúde humana: disponibilizar comercialmente um produto com eficácia comprovada e o consumo viável (INMETRO, 2013; VIEIRA e OHAYON, 2006).

Os bioensaios ou métodos bioanalíticos são procedimentos utilizados na indústria de imunobiológicos para verificação da qualidade e eficácia clínica de um dado produto e a resposta biológica, bioquímica ou fisiológica ao nível celular induzidas por interações imunológicas (ANVISA, 2012; OPAS, 2005; USP, 2010).

Estes métodos são processos de medição mais complexos quando comparados com grandezas físicas e químicas devido a particularidades do mensurando, que está presente em matrizes complexas muitas vezes em conjunto com outras substâncias que também possuem atividades biológicas que podem interagir entre si (BIA, 2001).

No desenvolvimento das vacinas é necessária a aplicação dos bioensaios validados para avaliar a resposta imunobiológica e a eficácia desses produtos (FIGUEIREDO *et al.*, 2016). No caso da vacina de Febre Amarela 17D, a resposta imunobiológica que é medida e que se correlaciona com a qualidade da proteção vacinal são os níveis de anticorpos neutralizantes presentes no soro de pacientes, e que são produzidos em resposta à exposição viral (JONKER *et al.*, 2013).

Todo resultado de medição é uma aproximação de um suposto valor verdadeiro de uma determinada propriedade onde a dúvida em torno desse valor é a sua incerteza. Avaliar a incerteza de medição é obter uma precisão estimada que captura as fontes de variação aleatória associadas ao processo de medição e o resultado deste processo só se torna completo quando acompanhado pela declaração da sua incerteza (INMETRO, 2012).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FEBRE AMARELA

2.1.1 Um novo velho problema

A Febre Amarela é uma doença infecciosa, não contagiosa, aguda em expansão no Brasil. A severidade da doença pode variar de uma gripe indiferenciável para uma febre hemorrágica que é fatal em 50% casos. A ocorrência de infecções não aparentes varia entre 5% a 50%, isto é, suas manifestações são na forma subclínica ou leve. Entretanto, continua sendo um problema de saúde pública no Brasil, causando dezenas de casos graves, muitos deles fatais, espalhando-se por regiões no país que até então não eram consideradas como áreas de riscos (MONATH, 2001; BENNETT, DOLI e BLASER, 2015; GOLDANI, 2017; POSSAS *et al.*, 2018).

A epidemia de Febre Amarela (FA) de 2018 tornou-se a mais severa das últimas sete décadas. Em dados atualizados pelo Ministério da Saúde (MS) o Brasil registrou, no período de 1º julho de 2017 a 16 de Fevereiro de 2018, 464 casos de febre amarela, sendo que 154 vieram a óbito (ver ANEXO A). Ao todo, foram notificados 1.626 casos suspeitos, sendo que 684 foram descartados e 478 permanecem em investigação, neste período. No mesmo período de 2017, foram 532 casos da doença e 166 óbitos confirmados (AGÊNCIA FIOCRUZ, 2018).

A maioria dos casos registrados são indivíduos do sexo masculino vivendo em áreas rurais no segmento econômico ativo da região e que não foram vacinados previamente. Essa população é mais exposta frequentemente em áreas de situação de risco, principalmente, devido a suas atividades de trabalho (GOLDANI, 2017). A maioria dos casos de Febre Amarela humana confirmados são localizados no estado de Minas Gerais (AGÊNCIA FIOCRUZ, 2018), porém o aumento se estende além das áreas consideradas endêmicas. A doença tem se expandindo para os demais estados, entretanto a causa da expansão é desconhecida (GOLDONI, 2017).

Esta doença pode ocorrer através de um ciclo de transmissão silvestre ou urbano. No ciclo silvestre, a transmissão do vírus ocorre entre primatas não-humanos através de mosquitos do gênero *Haemagogus* e *Sabethes* com surtos em intervalos cíclicos de três a sete anos que resultam da epizootia em primatas não humanos. O ciclo urbano, ocorre entre mosquitos urbanos, principalmente *Aedes aegypti* como

transmissor, e humanos infectados originalmente em áreas não rurais (GOLDANI, 2017).

A eliminação da transmissão urbana no Brasil e em toda América foi alcançada no início dos anos 1940 com a combinação de campanhas de vacinação e erradicação do principal vetor urbano. No entanto, o ciclo de transmissão silvestre zoonótico, isto é, mantido entre os mosquitos e primatas não humanos tem anualmente causado infecção e morte em humanos (GOLDANI, 2017).

O controle da Febre Amarela urbana no Rio de Janeiro teve início no último século e é reconhecido como uma das mais bem-sucedidas iniciativas de saúde pública do mundo. O sucesso da campanha de Oswaldo Cruz contra o vetor doméstico *Aedes aegypti* diminuiu dramaticamente o número de casos de Febre Amarela urbana na cidade. As medidas foram aplicadas com sucesso em todo o Brasil (GOLDANI, 2017).

Especialistas consideram que a urbanização da Febre Amarela requer altos índices de infestação domiciliar pelo *Aedes aegypti*. No surto que ocorreu em Angola em 2016, o país apresentou 28% de infestação domiciliar, enquanto o número observado nas cidades brasileiras é menor que 8%, devido à ação dos programas de combate à Dengue e, mais recentemente, à Chikungunya e Zika (NORONHA & CAMACHO, 2017).

Entretanto, a ocorrência de casos de Febre Amarela nos últimos anos pode estar relacionado, entre outros fatores, a presença do mosquito *Ae. albopictus* que coloniza áreas silvestres e urbana servindo de “vetor ponte” entre os dois ciclos da doença (LIMA, 2017). A competência dessa espécie em transmitir Febre Amarela de diferentes linhagens indica elevado risco de ressurgimento da febre amarela urbana no Brasil (LIMA, 2017).

Diante do risco de reurbanização da febre amarela no Brasil, gestores e especialistas consideram fundamental a expansão da vacinação contra esta doença para a população urbana. Por outro lado, alguns especialistas propõem que a discussão da recomendação da vacina para todo o país deva ser feita somente depois de encerrado o surto, cujo controle exige intensa mobilização dos recursos para a população sob risco imediato da doença (NORONHA & CAMACHO, 2017).

2.1.2 O vírus

O vírus da Febre Amarela é um protótipo dos genes Flavivirus (do latim *flavus* = amarelo), família *Flaviviridae*, que compreende aproximadamente 70 viroses em sua maioria que são adquiridas por artrópodes. Através do sequenciamento genético, o vírus aparece relacionado a outros vírus transmitidos por mosquitos há 3000 anos. No novo mundo, a doença foi, provavelmente, trazida da África durante o tráfico de escravos (MONATH, 2001).

O genoma do vírus da Febre Amarela que causou o surto em 2017 no Espírito Santo foi sequenciado e a análise filogenética revelou que ele se aglomera na subclasse 1E, juntamente com as cepas brasileiras e venezuelanas. Descobertas recentes identificaram que esta cepa apresenta sete novas mutações e sua influência na infecção do hospedeiro, replicação e disseminação viral ainda estão sendo investigados (PASSOS *et al.* 2018).

O genoma do vírus da Febre Amarela possui uma região codificante com 10233 nucleotídeos que codificam três proteínas estruturais e sete não estruturais, flanqueadas por uma região curta não codificante. As proteínas estruturais são incorporadas em partículas virais maduras, enquanto as proteínas não estruturais são responsáveis pela replicação e infecção das células. O envelope viral consiste em uma bicamada lipídica derivada da célula infectada, com dímeros da proteína envelope na superfície que é ancorada em suas caldas hidrofóbicas. A proteína do envelope é responsável pela fase inicial da infecção das células e também é responsável pela resposta imune do hospedeiro (MONATH, 2001).

A replicação viral ocorre no interior da célula hospedeira evoluindo nas seguintes etapas: adsorção, penetração, desnudamento, transcrição, tradução, maturação e liberação (ver figura 1). Na etapa de adsorção, a interação do vírus com a célula hospedeira ocorre endocitose mediada por receptores celulares específicos para proteínas do envelope viral. A penetração ocorre através do mecanismo de fusão, que depende de uma temperatura adequada em torno de 37 °C, entre o envelope viral com a membrana celular e conseqüentemente entrega o nucleocapsídeo ao citoplasma (desnudamento), onde ocorre a transcrição e tradução do RNA genômico (de polaridade positiva) (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005; STEPHEN *et al.*, 2008; SIMÕES, 2011).

A replicação do genoma ocorre em membranas intracelulares. A montagem de vírus ocorre na superfície do retículo endoplasmático (ER) quando as proteínas estruturais e os genes do RNA recém-sintetizados se inserem no lúmen da ER. As partículas virais e subvirais não-infecciosas, não infecciosas resultantes são transportadas através da rede trans-Golgi (TGN). As partículas de virion imaturo são clivadas pela protease furina hospedeira, resultando em partículas infecciosas maduras. As partículas subvirais também são clivadas por furina. Os viriões maduros e as partículas subvirais são posteriormente libertados pela exocitose. A saída do vírus ocorre através da lise celular devido a quantidade de vírus produzida no interior da célula que se rompe liberando novas partículas virais que entrarão em outras células (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005; STEPHEN *et al.*, 2008; SIMÕES, 2011). Esse rompimento é visível em culturas de células *in vitro* e são chamados de plaques (Ver figura 2).

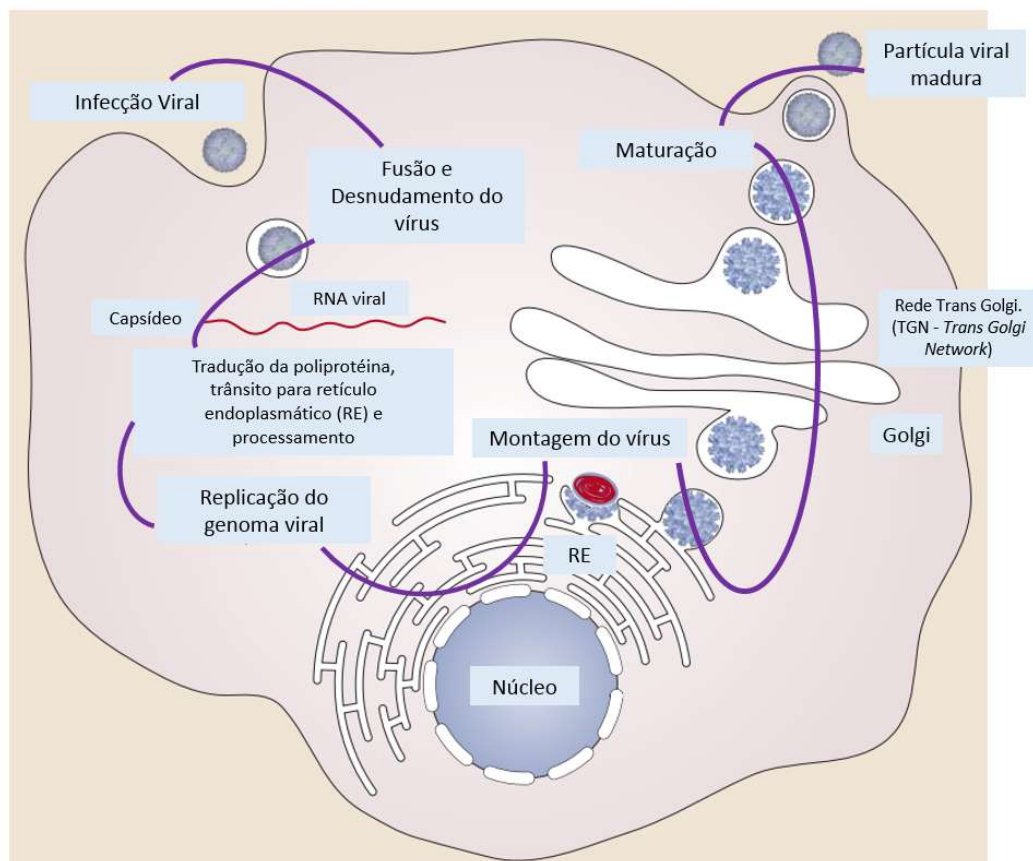


Figura 1 - Ciclo de vida de Flavivírus
 FONTE: Adaptado de MUKHOPADHYAY *et al.* (2005)

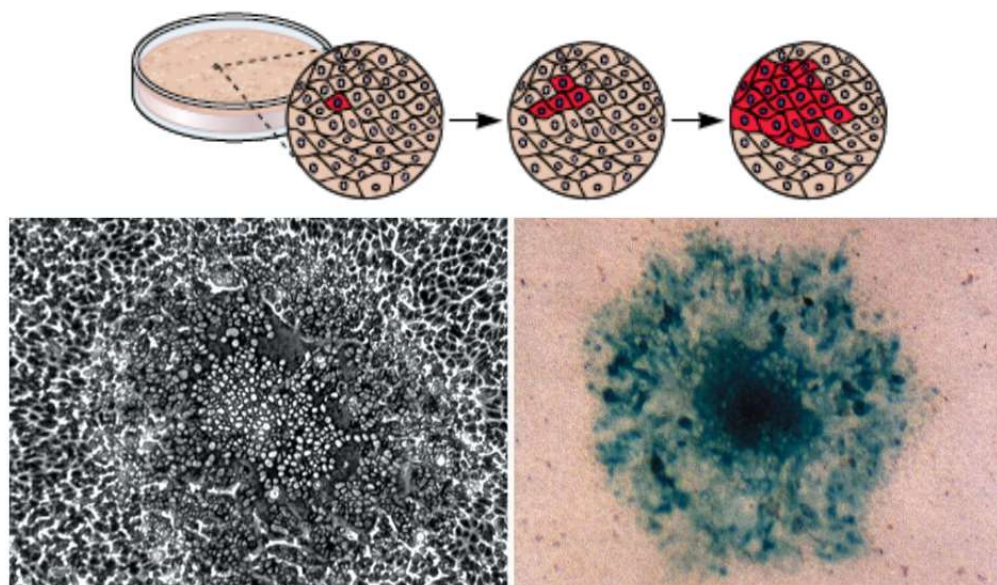


Figura 2 - Formação de plaques de lise em cultura celular *in vitro*
 FONTE: Adaptado de FLINT *et al.* (2009)

A infecção pelo vírus da Febre Amarela é seguida por uma resposta imune rápida e específica (quatro a seis dias). Os anticorpos imunoglobulina M (IGM) medidos pelo ensaio de imunoabsorção enzimática ou *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), aparecem durante a primeira semana da doença e têm um pico na segunda semana, geralmente este anticorpo diminui rapidamente ao passar dos meses. Os anticorpos neutralizantes aparecem rapidamente no final da primeira semana após o início da doença e persistem por muitos anos (MONATH, 2001; BENNETT, DOLI e BLASER, 2015).

Os anticorpos neutralizantes são os principais mediadores de proteção contra a doença e reexposição ao vírus (MONATH, 2001); estes anticorpos ligam-se ao antígeno fazendo com que o antígeno não reconheça a célula hospedeira. Com isso a infecção da célula é inibida. No caso vírus da Febre Amarela, estes anticorpos ligam-se aos antígenos virais e previne que o vírus ligue-se aos receptores das células (MONATH, 2001; NEUTA, 2009).

Devido à prevalência destes anticorpos e a sua capacidade de neutralização da atividade biológica do vírus, a determinação desses anticorpos é utilizada em estudos de vacinas como marcadores de proteção seguido da imunização para avaliação da eficácia clínica de vacinas e da resposta imune de indivíduos infectados ou vacinados, podendo ser determinados em testes *in vivo* ou *in vitro* (MONATH, 2001; NEUTA, 2009; SALJE *et al.*, 2013).

A infecção prévia de um indivíduo por outros flavivírus heterólogos podem, dependendo do vírus específico que causa infecção prévia, modular a expressão da doença e a gravidade da Febre Amarela. Há evidências que sugerem que, particularmente, a infecção por dengue e para o vírus Zika podem parcialmente proteger contra a Febre Amarela (MONATH, 2001).

Até o momento, não existe um tratamento específico ou uma terapia antiviral para a Febre Amarela e a maioria dos casos necessitam de monitoramento clínico e cuidados para prevenir a transmissão. Estudos exploratórios em pequenos modelos animais e primatas não humanos de alguns compostos (por exemplo interferons e ribavirina) tiveram resultados variados (BENNETT, DOLI e BLASER, 2015). Contudo, a vacinação é a medida profilática para combater o vírus da Febre Amarela (MONATH, 2001; BENNETT, DOLI e BLASER, 2015; POSSAS *et al.*; 2018).

2.1.3 A vacina

Desde 1937, a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (antigo Instituto Soroterápico de Manguinhos) desenvolve as preparações vacinais em seus laboratórios a partir da cepa atenuada 17D do vírus da Febre Amarela, cultivada em ovos embrionados de galinha livres de agentes patogênicos (SPF – do inglês *specific pathogen free*), de acordo com as normas estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (STEPHEN *et al.*, 2009; BIOMANGUINHOS, 2018).

Uma única dose de 0,5 mL subcutânea produz imunidade em mais de 95% dos pacientes por pelo menos 10 anos e possivelmente a vida toda, mas de acordo com MONATH *et al.* (2016) estudos clínicos têm mostrado que uma redução na dose para 0,1 mL é efetiva para estimular a imunidade rapidamente, desde que seja utilizada a formulação já existente. Pesquisas recentes realizadas no Brasil, revelam que doses da vacina diluída também são capazes de gerar imunidade por até 8 anos (AGÊNCIA FIOCRUZ, 2018).

A vacina 17D contém vírus vivos com o material genético alterado que infectam o hospedeiro e estimulando uma resposta imune, mas raramente causam doenças (STEPHENS *et al.*, 2009). No entanto, em certos pacientes imunocomprometidos, mesmo os microrganismos atenuados podem ser perigosos, de modo que a supressão imune manifesta pode ser uma contraindicação para vacinas

vivas (MONATH, 2001; BENNETT, DOLI e BLASER, 2015; MONATH *et al.*, 2016; PASSOS; 2018).

O Ministério da Saúde (MS) do Brasil, através do Programa Nacional de Imunizações (PNI), recomenda que a vacina seja aplicada a partir dos nove meses de vida, sendo importante o reforço, no mínimo, de dez em dez anos, especialmente para quem vive ou vai viajar para regiões endêmicas (BIOMANGUINHOS, 2018).

Devido ao recente surto, o Ministério da Saúde (MS) já enviou 14,3 milhões de doses de vacina para os estados afetados e distribuiu 650.000 doses por todo o país para atender as demandas do Calendário Nacional de Vacinação de janeiro de 2017 (PASSOS *et al.*, 2018). Cabe dizer que a vacinação não era amplamente recomendada por não ser uma doença endêmica, em todo território nacional, se restringindo a alguns estados e devido aos sérios eventos adversos associados que podem acontecer, mas diante do risco do aumento da transmissão, a relação risco-benefício pesou a favor da vacinação (PASSOS *et al.*, 2018).

Diante dos aumentos de casos já citados, a OMS recomendou o uso da dose da vacina fracionada como medida preventiva. A adoção do fracionamento das vacinas é uma medida tomada quando há aumento de epizootias e casos de febre amarela silvestre de forma intensa, com risco de expansão da doença em cidades com elevado índice populacional (GOLDANI, 2017; PASSOS *et al.*, 2018).

2.1.4 Monitoramento da resposta imune

As respostas imunológicas são o mecanismo de defesa natural dos vertebrados contra doença causadas por patógenos e a imunogenicidade é a capacidade de um antígeno provocar respostas imunes (YANG *et al.*, 2016). Existem dois tipos de resposta imune: a resposta inata ou não específica e a resposta adaptativa ou imune específica (NEUTA, 2009):

- a) A resposta imune inata é a que fornece uma resposta imediata, embora não específica para invadir patógenos. É desencadeada por células e moléculas que reconhecem estruturas moleculares de microrganismos, e tentam inibir ou controlar sua replicação. Nos vertebrados, uma das primeiras respostas da imunidade inata é a inflamação iniciada por células infectadas que em resposta liberam algumas moléculas como histamina, prostaglandinas dentre outras (NEUTA, 2009).

- b) A resposta imune específica, também conhecida por resposta imune mediado por células, tem a capacidade de melhorar o reconhecimento de um patógeno, para adaptar uma resposta específica à estrutura real desse patógeno e memorizá-la como preparação para futuros desafios com o mesmo ou um patógeno semelhante (NEUTA, 2009; YANG *et al.*, 2016).

O monitoramento da resposta imune é o estudo dos parâmetros imunológicos produzidos por um organismo durante uma intervenção terapêutica, de natureza experimental, geralmente realizado por laboratórios de pesquisa e desenvolvimento durante as fases da pesquisa clínica (SHANKAR, 2002).

Seu o objetivo é determinar a imunogenicidade, de produtos biológicos, durante uma intervenção terapêutica e compreende testes dos parâmetros imunes dos indivíduos tratados, normalmente, antes e várias vezes após a administração de uma vacina. Esses resultados são utilizados no registro de produtos, estudos de bioequivalência e outras submissões regulatórias (SHANKAR, 2002).

Os estudos de monitoramento imunológico incluem (SHANKAR, 2002):

- a) a caracterização da resposta imune através da determinação da magnitude e do tempo das respostas imunitárias relevantes;
- b) as características fenotípicas de células imunitárias induzidas pós-tratamento;
- c) os tipos de citocinas produzidas;
- d) os tipos de anticorpos induzidos;
- e) determinação dos efeitos colaterais da vacina de teste (por exemplo, respostas autoimunes);
- f) a indução de anticorpos neutralizantes ou de bloqueio que inibem a imunogenicidade de vacinações de reforço;
- g) caracterização de outros parâmetros imunológicos afetados pelo tratamento.

A compreensão dos parâmetros imunológicos ajuda a definir a melhor estratégia de tratamento e leva a obter preditores indiretos de eficácia clínica, isto é, a indicação que o resultado primário desejado de qualquer terapia foi alcançado. No caso da vacina de Febre Amarela 17D, o parâmetro imunológico que se correlaciona com a proteção vacinal é o título de anticorpos neutralizantes presente nas amostras de soro de pacientes, os quais são produzidos em resposta à exposição viral (SHANKAR, 2002; JONKER *et al.*, 2013).

2.1.5 Ensaio biológicos

Os bioensaios ou métodos bioanalíticos são procedimentos utilizados na determinação quantitativa de analitos em matrizes biológicas (ANVISA, 2012) e na indústria de imunobiológicos, são utilizados para verificação de inocuidade, imunogenicidade, toxicidade e demais testes de desempenho (OPAS, 2005; ANVISA, 2012).

Esses ensaios medem a resposta biológica de um organismo com relação a um produto; a resposta bioquímica ou fisiológica ao nível celular; as taxas de reação enzimática ou respostas biológicas induzidas por interações imunológicas. (USP, 2010). De acordo com a OMS (1997) os bioensaios apresentam três categorias:

- a) Ensaio em ligação: são aqueles que envolvem a ligação de uma ou mais moléculas como anticorpos e antígenos, de forma específica. Esta especificidade é dada através da afinidade entre anticorpo e epítipo (região do antígeno que ocorre a ligação com o anticorpo), da valência do antígeno e anticorpo e também pelo arranjo estrutural da interação (WHO, 1997), exemplo.: ELISA.
- b) Ensaio em célula: são aqueles em que o produto induz uma resposta mensurável nas células específicas: a aglutinação, a lise de células, fusão de células, ou a geração de um produto químico detectável específico. Esses ensaios apresentam uma variabilidade maior do que os ensaios de ligação e devem ser realizados com cuidado para garantir resultados consistentes (WHO, 1997). Exemplo: Teste de neutralização por redução de placas de lise (PRNT).
- c) Ensaio em animais: são ensaios complexos que envolvem o cuidado, manutenção e manipulação de cobaias como camundongos, coelhos, macacos, entre outros (FIGUEIREDO, 2014) para a realização de ensaios conforme testes de pirogênio, segurança geral (toxicologia) e potência (WHO, 1997). Exemplo: testes de proteção de camundongos.

As variações de sensibilidade individual desses ensaios devem-se às particularidades do sistema imunológico dos pacientes somada à natureza das matrizes biológicas e das particularidades do ensaio proporcionando uma grande variabilidade nos resultados. Fatores operacionais como a amostragem e o preparo da amostra são incluídos como fontes de interferência, sendo essas variações

entendidas e aceitáveis pelos órgãos reguladores. (FDA, 2001; USP, 2010; LIMA, 2011).

As metodologias bioanalíticas devem ser validadas a fim de evidenciar que um bioensaio é apropriado para a finalidade pretendida e tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida. No Brasil a RDC nº 27 de 2012, legislação vigente para a validação de bioensaios utilizados durante as etapas de pré e pós registro de produtos farmacêuticos, não abrange a complexidade de todos os bioensaios. Os critérios de validação para ensaios biológicos de acordo, com a referida legislação, foram amplamente discutidos por FIGUEIREDO (2016) e MIRANDA (2014). Ambos os trabalhos tiveram o PRNT como objeto de estudo. Este ensaio é utilizado em estudos de imunogenicidade de vacinas.

Para os ensaios aplicados neste tipo de estudo, é necessário a utilização de outros guias e compêndios para que a validação se torne mais direcionada, pois a descrição da validação contida na RDC 27/2012 está voltada para métodos instrumentais, não abrangendo assim os ensaios sorológicos e imunológicos (FIGUEIREDO *et al.*, 2016). Na referida legislação, a incerteza de medição não é parâmetro a ser avaliado.

2.1.6 Níveis de anticorpos neutralizantes

Os níveis de anticorpos neutralizantes em amostras de soro podem ser mensurados como títulos de anticorpos em recíproca da diluição (1:X) ou como concentrações de anticorpos em miliunidades internacionais por mililitro (mUI/mL). Ambas as grandezas, permitem a padronização dos resultados ao nível internacional, fornecendo uma base para um consenso sobre a medição do estado imunológico de indivíduos ou populações após a vacinação ou infecção natural (WHO,2006; NAUTA, 2009; JONKER *et al.*, 2013;).

Por definição, os títulos de anticorpos são adimensionais, isto é, um número desprovido de qualquer unidade física, química ou biológica que o defina, pois é definido com o quociente da quantidade cujas unidades se cancela, neste caso a grandeza cuja unidades se cancelam é o volume. As concentrações de anticorpos medem a quantidade de proteína específica de anticorpo por soro em mUI/mL (NAUTA, 2009).

Um título de anticorpo em recíproca da diluição é uma medida da quantidade de anticorpo em soro, o resultado é expresso como 1:X, onde x é a diluição da amostra que a leitura do ensaio ocorreu. Para determinar o título de anticorpos, uma amostra de soro é submetida a uma diluição seriada, onde o fator de diluição é o volume final dividido pelo volume inicial da solução diluída (NAUTA, 2009).

Por exemplo, na Figura 3, em uma placa de 96 orifícios, uma amostra submetida a diluição inicial de 1: 5 e um fator de diluição de 2 resultará nas seguintes diluições 1:10; 1:20, 1:40 e assim por diante, partindo do orifício H1 a A1. A cada diluição, é adicionada uma quantidade de uma suspensão viral fixa. Após a execução do ensaio, é realizada a leitura das unidades formadoras de placas de lise (PFU – do inglês, *plaque formation unit*) que indicará a presença ou ausência de atividade de anticorpos contra o antígeno viral.

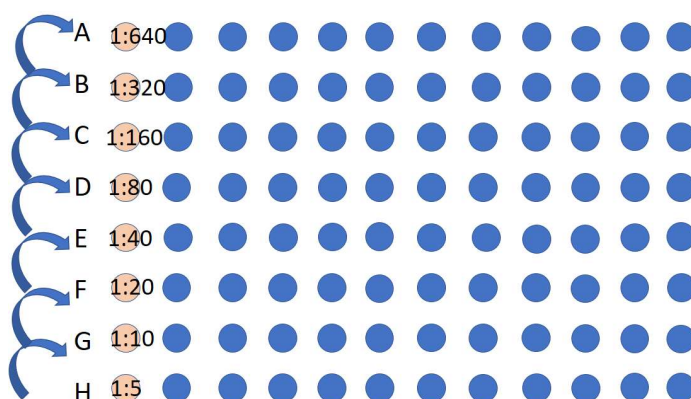


Figura 3 - Esquema de diluição seriada em uma placa de 96 orifícios
Fonte: o autor (2018).

Suponha que em um ensaio, uma amostra positiva para um dado alvo viral, isto é, que contenha uma concentração de anticorpos neutralizantes, é submetida a uma diluição (fator 2) a partir de 1:5 até 1:640 conforme a Figura 3. Caso a quantidade de anticorpos presentes nessa amostra seja alta a ponto de neutralizar todos os vírus contidos no orifício, não haverá presença de placas de lise, indicando que a quantidade de anticorpos extrapolou a faixa do ensaio, neste caso o resultado será a recíproca da maior diluição (1:640). Por outro lado, um soro com baixa quantidade de anticorpos apresentará resultados em diluições menores, quando um soro não apresenta título de anticorpos neutralizantes o resultado é notado como <1:5.

Para converter resultados de títulos em recíproca da diluição UI, é necessário a utilização de um soro de referência internacional ou um soro *in-house* caracterizado

e calibrado contra uma referência que será utilizado como soro positivo do ensaio. A equação abaixo descreve a conversão dos resultados em recíproca da diluição para mUI/mL (FELTKAMP, 1996; COHEN, 2007):

$$C_{UI/ml} = T_a \times \left(\frac{C_{SR}}{T_{CP}} \right) \quad (1)$$

Onde,

$C_{UI/ml}$, concentração do soro amostral em UI/mL

T_a , título do soro amostral em recíproca da diluição

C_{SR} , concentração nominal do soro de referência ou soro *in-house*

T_{CP} , título em recíproca da diluição do controle positivo (soro de referência ou soro *in-house*)

2.1.7 Teste de neutralização por redução de placas de lise para placa de lise (PRNT)

O teste de neutralização por redução de placa de lise (PRNT – do inglês, *plaque reduction neutralization test*) é fundamentado no princípio de que o vírus na presença de anticorpos específicos é neutralizado perdendo a capacidade de infectar células permissivas, sendo reconhecido como padrão ouro empregado na quantificação de anticorpos neutralizantes, presente nas amostras de soro de indivíduos que foram expostos ao vírus selvagem ou vacinal. (ROEHRIG *et al.* 2008; SANTOS & BENATI, 2008).

Este teste é um ensaio de ligação e um ensaio em células realizado *in vitro*, onde uma quantidade conhecida de vírus é adicionada a diluições seriadas de soro permitindo avaliar a capacidade de impedir a formação de placas de lise em células, pois em um primeiro momento ocorre ligação dos anticorpos neutralizantes (ensaio de ligação) presente em um soro amostral no vírus em suspensão depois, adiciona-se uma suspensão celular com concentração pré-definida (ensaio em célula).

Caso haja presença de anticorpos neutralizantes (soro positivo), o vírus será neutralizado eliminando o efeito citopático, impedindo a formação de plaques de lise. No caso da ausência desses anticorpos, o vírus estará livre para entrar nas células e dar início ao ciclo lítico, causando efeito citopático na célula e conseqüentemente formando plaques de lise (Figura 4).

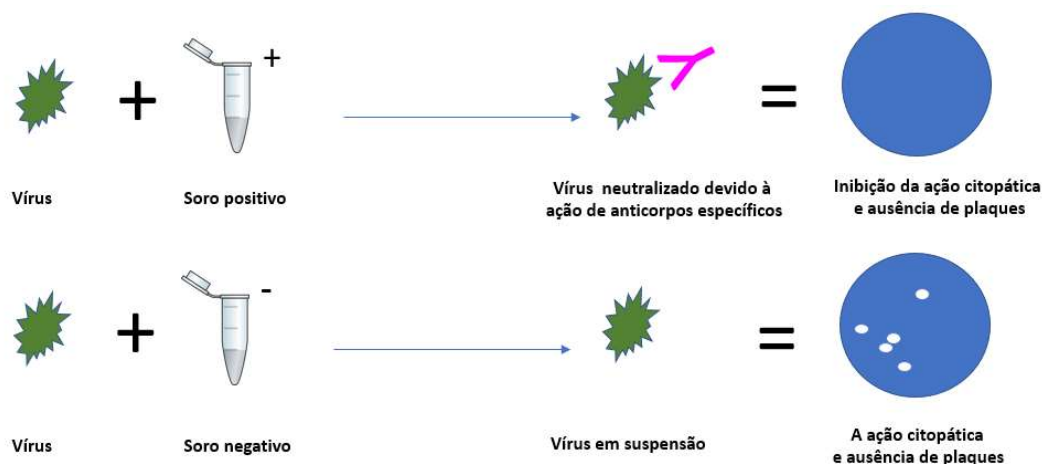


Figura 4 - Princípio do teste de neutralização
Fonte: o autor (2018)

O PRNT é amplamente empregado em estudos com vacinas como potencial marcador da proteção seguida da imunização (SALJE *et al.*, 2014). Dentre os parâmetros utilizados para determinar a imunização de indivíduos vacinados, o PRNT50 é a estimativa da diluição que produz uma redução de 50% de PFU em comparação ao número de plaques formado em uma monocamada de células Vero pelo controle viral (SALJE *et al.*, 2014). Para quantificação de anticorpos pode-se avaliar o PRNT em diferentes faixas de neutralização (PRNT50, PRNT90 entre outros), porém o mais empregado para avaliação da eficácia vacinal de febre amarela é o PRNT50, por apresentar uma boa acurácia global, ou seja, sensibilidade e especificidade ideal.

O PRNT original foi desenvolvido e ainda é realizado em placas de 6 orifícios, visando ampliar a capacidade de testagem do ensaio, SIMÕES (2012) desenvolveu e validou o micro-PRNT utilizando placas de 96 orifícios (ver Figura 5). O micro-PRNT é o objeto de estudo deste trabalho e as características podem ser vistas a seguir:

- a) Mensurando (cor amarela, colunas 2 a 9): o mensurando do ensaio é título de anticorpos neutralizantes em soro humano ou animal. De acordo com NEUTA (2011), quando o resultado for expresso em recíproca da diluição é chamado de títulos de anticorpos, quando o mesmo for expresso em Unidades Internacionais por mililitro, é chamado de concentração de anticorpos. As amostras de soros precisam ser aquecidas a 56°C com finalidade de inativar o sistema complemento que é o conjunto de 20

enzimas presentes no soro e são uma parte da resposta do sistema imunológico a reações antígeno-anticorpo.

- b) Diluição Seriada: A diluição seriada é amplamente usada em biomedicina e outras ciências biológicas com a finalidade de diminuir o número de interferentes no ensaio, como anticorpos inespecíficos e para determinar o título ou a concentração de anticorpos em testes semi-quantitativos. Uma vez que conforme a amostra encontra-se diluída, o alvo analítico se torna mais específico.

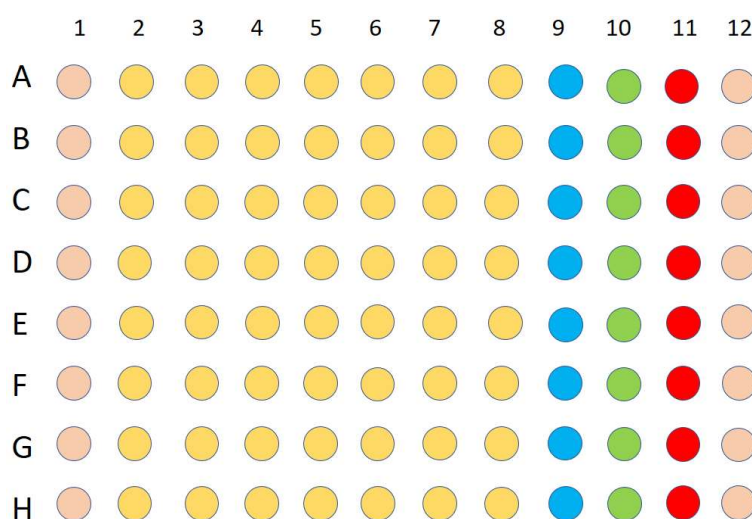


Figura 5 - Desenho da placa do ensaio micro-PRNT

Fonte: o autor (2018).

- c) Controle Positivo (coluna 11, cor vermelha): O controle positivo é um soro de referência internacional ou um soro calibrado e padronizado *in-house*. Tem a finalidade de controlar a qualidade do ensaio uma vez que este soro passa por todo processo que os soros amostrais. Por se tratar de um soro com valor conhecido, é utilizado para determinar a concentração de anticorpos presente nas amostras.
- d) Controle Negativo (coluna 9, cor azul): É utilizado um soro sabidamente negativo para o alvo do teste, isto é, sem a presença de anticorpos neutralizantes do vírus de Febre Amarela.
- e) Controle de Vírus (coluna 10, cor verde): É utilizado como controle do ensaio através do valor esperado de plaques que deve estar entre 20-60 placas de lise por orifício. É através deste controle que é determinado o *endpoint* do ensaio.

- f) Controle de célula (coluna 1 e 12, cor rosa): Durante a pipetagem da suspensão celular, as colunas das extremidades são destinadas apenas a suspensão celular com o objetivo de avaliar a qualidade da formação da monocamada, e em caso de ausência de formação de plaques durante um ensaio é possível garantir que o problema não foi a ausência de células. Os controles são adicionados nas extremidades, pois a monocamada pode sofrer efeito de borda que causa um “ressecamento” que poderia afetar a qualidade dos resultados dos soros e do controle viral.
- g) *Endpoint*: É o ponto onde há uma redução de 50% ou 90% do número das placas de lise em relação ao número de plaques obtidos no controle de vírus. Assim, o título do PRNT foi definido como a recíproca da última diluição do soro que reduz o número de placas de lise em 50% ou 90%. O *endpoint* de 50% do teste foi determinado dividindo a média aritmética do número de placas de lise obtidas no controle de vírus por 2 (SIMÕES, 2011).
- h) Ponto de corte (*Cutoff*): O ponto de corte é o valor de decisão clínica em imunoenaios, onde os resultados numéricos das amostras são classificados em uma escala ordinal de acordo com o ponto de corte. Os resultados podem ser binários (positivos ou negativos) ou ternários (positivos, indeterminados ou negativos). No micro-PRNT os resultados podem ser negativos ou positivos se estiverem abaixo ou acima do valor de 794 mUI/mL (SIMÕES, 2012). De acordo com PEREIRA *et al.* (2015), valores numéricos iguais ou próximos à linha de corte têm uma chance significativa de serem falsos, por isso a incerteza de medição no valor de corte deve ser determinada utilizando uma incerteza expandida, este intervalo é designado como "zona cinza". Conseqüentemente, o laboratório deve aplicar uma classificação ternária aos resultados numéricos garantindo confiabilidade dos resultados.

2.2 METROLOGIA

A Metrologia, a ciência das medições, providencia ferramentas, tais como calibração, controle metrológico legal, padrões internacionais, materiais de referências, métodos de referência, rastreabilidade e incerteza de medição para garantir a confiabilidade das tecnologias utilizadas. Um dos seus benefícios é a

melhoria do entendimento científico sobre o mensurando, e vem sendo aplicada por cientistas no mundo acadêmico que estão interessados no desenvolvimento de novas e avançadas metodologias de medição (Co-NANOMET, 2010).

Este campo de conhecimento engloba todos os aspectos teóricos e práticos da medição, qualquer que seja a incerteza de medição e o campo de aplicação. Entretanto, ainda que nas medições físicas e químicas, a infraestrutura metrológica e a incertezas são amplamente discutidas e estudadas, as medições de parâmetros biológicos são ainda um desafio em termos de intercomparabilidade e rastreabilidade metrológica, impactando na área da saúde, segurança alimentar, agricultura, meio ambiente, processos produtivos que empregam biotecnologia entre outras atividades (INMETRO, 2012).

A Metrologia, quando aplicada às biociências, é chamada de Biometrologia, que visa contribuir para a comparabilidade e reprodutibilidade internacional das biomedidas. Este segmento vem evoluindo significativamente nos últimos 15 anos, sendo reconhecido pelo *Bureau* Internacional de Pesos Medidas (BIPM), através do *Consultative Committee for Amount of Substance: Metrology in Chemistry and Biology* (CCQM) *Working Group on Bioassay* (BAWG), grupo responsável por conduzir pesquisas metrológicas com aplicação a bioensaios (INMETRO, 2013; CCQM, 2015).

Devido à variedade de biomedições possíveis, em abril de 2015 o BAWG dividiu suas atividades em três grupos de trabalho (CCQM, 2015):

- a) CCQM *Working Group on Protein Analysis* (PAWG): cujo escopo inclui os aspectos críticos em medições de proteína como análise quantitativa e qualitativa, análise de estrutura e a atividade e as suas interações.
- b) CCQM *Working Group on Cell Analysis* (CAWG): visa estabelecer a comparabilidade das medições celulares através de sistemas de medição de referência bioanalíticos da mais alta ordem metrológica possível com aplicação clínica, farmacêutica e agências reguladoras.
- c) CCQM *Working Group on Nucleic Acid Analysis* (NAWG): o escopo de medições inclui, mas não se limitam a cromossomos, ácido desoxirribonucleico (DNA), nucleotídeos, oligonucleotídeos, DNA modificado (por exemplo, a metilação do DNA e outras modificações epigenéticas), ácido ribonucleico mensageiro (mRNA), micro ácido nucléico (micro-RNA) e outros ácidos nucléicos (RNA) curtos não codificantes num

contexto de medição biológica. Além disso, a identificação e quantificação de ácidos nucleicos em matrizes complexas.

De acordo com ERRIU (2013), a Biometrologia pode ser dividida em três classes diferentes, relacionadas a fatores estritamente interligados como: o tipo de método de medição a ser utilizado (ex.: teste de neutralização, fluorescência, ensaio de ligação antígeno-anticorpo); o tipo de material biológico a ser analisado (ex.: soro humano, sangue, urina, células): e, por último, o tipo de fenômeno biológico a ser descrito (ex.: redução de plaques de lise celular, hemaglutinação).

A definição de método de medição aplicável para executar medições na biologia está intimamente relacionada ao material analisado e o fenômeno a ser descrito. A dimensão do material biológico (Quadro 1) e a sua estabilidade faz com que seja difícil obter um bom nível de exatidão e precisão ao mesmo tempo. Em adição, fenômenos específicos relacionados ao mensurando muitas das vezes precisam mais que um resultado ou metodologia para serem entendidos e explicados (ERRIU, 2013).

Quadro 1 - Biometrologia

Biometrologia	
Subdivisões	Materiais biológicos X Dimensão
Classe I - Tipo de método de medição a ser utilizado (ex.: teste de neutralização, fluorescência, ensaio de ligação antígeno-anticorpo)	(0,3 - 3) nm: moléculas pequenas
	4-20 nm: proteínas
	2-200 nm: glicanos
Classe II - Tipo de material biológico a ser analisado (ex.: soro humano, sangue, urina, células)	2 nm-2 m (em comprimento): ácidos nucleicos
	4-100 nm: Vírus
Classe III - Tipo de fenômeno biológico a ser descrito (redução de plaques de lise celular, hemaglutinação)	0,2-2 μ m: Bactérias
	2-30 μ m: Células de leveduras
	2-10 μ m: Células de mamíferos

Fonte: o autor (2018)

2.2.1 Unidade e Grandeza

Grandeza é um atributo físico, químico ou biológico de um corpo ou substância que pode ser qualitativamente distinguido e quantitativamente determinado. (IPEM-SP, 2013) por exemplo, a concentração de anticorpos neutralizantes para o vírus da Febre Amarela em amostras de soro. A concentração de anticorpos neutralizantes para um dado vírus é um atributo de uma amostra de sangue, qualitativamente distinguível de contagem de eritrócitos e quantitativamente definido pela unidade Unidades Internacionais por mililitro (UI/mL), pois pode ser expresso em números. Este conceito genérico pode ser dividido em vários níveis de conceitos específicos conforme o tipo de medição que será realizada, por exemplo, “grandeza física”, “grandeza química” e “grandeza biológica”, ou grandeza de base e grandeza derivada.

2.2.2 Mensurando

O entendimento do mensurando está intimamente ligado ao conhecimento da natureza de uma grandeza que é a “propriedade ou fenômeno de um corpo ou de uma substância, que pode ser expressa quantitativamente sob a forma de um número e de uma referência”. Sendo esta referência uma unidade de medida, um procedimento de medição, um material de referência ou uma combinação destes (INMETRO, 2012)

Os processos de medição são mais complexos na biotecnologia quando comparados com grandezas físicas e químicas devido à variedade de medições que podem ser realizadas (quadro 2) possuindo as seguintes particularidades (BIA, 2009):

1. Nessas medições, o mensurando está presente em matrizes complexas muitas das vezes em conjunto com outras substâncias que também possuem atividades biológicas que certamente estarão interagindo entre si;
2. Medições em biociências estão relacionadas com a identificação da natureza molecular e a caracterização da estrutura do mensurando;
3. A grande variedade de medições que podem ser realizadas não segue modelos convencionais de medidas, essa dificuldade aumenta consideravelmente em análise de sequência de ácidos nucleicos, proteínas e células.

Na maioria dos casos, um dado mensurando (Y) não é medido diretamente, mas é determinado a partir de N outras grandezas X_1, X_2, \dots, X_N por uma relação funcional f (INMETRO, 2012):

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_N) \quad (2)$$

As grandezas de entradas X_1, X_2, \dots, X_N podem ser consideradas mensurando e depender de outras grandezas, incluindo correções e fatores de correções, levando uma relação complexa que talvez não seja descrita. Entretanto, o entendimento do mensurando juntamente da definição do sistema de medição, das condições sob as quais a medida é realizada e dos fatores modificadores são necessários para a realização de uma medição de maneira adequada, pois o valor da grandeza que está sendo medida pode diferir da definição do mensurando como ele foi definido. (INMETRO, 2012).

Quadro 2 - Medições em biotecnologia

Alvo de medição	Mensurando
Ácido nucleico	Sequência de bases
	Comprimento de sequência de bases
	Quantidade
Proteína	Identidade, através de sequência de fragmento de peptídeos e aminoácidos.
	Quantidade
	Tamanho – massa e fragmento peptídico
	Função – ligação, transdução de sinal, receptores
	Atividade – catálise enzimática e afinidade do anticorpo
	Estrutura - primária através da quaternária
Células e Tecidos	Identidade
	Quantificação – contagem de células
	Tamanho – triagem de célula
	Viabilidade – crescimento e resposta
	Funcionalidade celular – metabolismo e expressão gênica
	Interação – adesão, reconhecimento e toxicidade

Fonte: *Biotech Industry Association* (2001)

2.2.3 Incerteza de medição

O verbete “incerteza” significa dúvida e, no sentido mais amplo, “incerteza de medição” é a dúvida acerca da validade do resultado de uma medição. Todo resultado de medição é uma aproximação de um suposto valor verdadeiro de uma determinada propriedade onde a dúvida em torno desse valor é a sua incerteza. Sabendo disso, a caracterização dessa dispersão de valores dentro de uma dada probabilidade

representa a faixa em que o valor verdadeiro está localizado (INMETRO, 2008; INMETRO, 2012; WEITZEL, 2014)

Uma das tarefas principais na Metrologia é a determinação das incertezas de medição (PTB, 2016) que é um parâmetro não negativo associado ao resultado de medição, que caracteriza a dispersão de valores que poderiam ser razoavelmente atribuídas ao mensurando (INMETRO, 2008). É através de sua estimativa que os aspectos teóricos e práticos que influenciam o resultado são avaliados.

A sua estimativa resulta de muitos componentes (u), onde alguns são estimados com base em distribuições estatísticas resultantes de uma série de medições (incerteza-padrão tipo A – u_A) ou por meio de distribuição estatísticas supostas baseadas na experiência ou em outras informações como certificado de calibração, tolerâncias e etc. (incerteza-padrão tipo B – u_B). (INMETRO, 2012).

A incerteza de medição é um parâmetro importante que proporciona dois grandes benefícios: confiabilidade ao resultado e aprimoramento da metodologia:

- a) Confiabilidade do resultado: A incerteza quando associada ao resultado de uma medição permite a interpretação correta, pois caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao valor de mensurando, isto é, é a faixa em que o valor verdadeiro está localizado dentro de uma dada probabilidade (INMETRO, 2008; WEITZEL, 2014). Sendo assim, a incerteza quantifica a qualidade do resultado.
- b) Aprimoramento da metodologia: Através dos estudos de avaliação de incerteza é possível obter informações com relação a fontes de variabilidade que contribuem com a incerteza e quando associadas ao modelo de melhoria contínua dão confiabilidade ao resultado bioanalíticos, e melhoria do ensaio. WEITZEL (2014) propõe a associação da avaliação da incerteza de medição em um ciclo de *Quality-by-design* (QbD) para metodologias analíticas, onde a incerteza de medição é um parâmetro para avaliar possíveis alterações de qualidade analítica onde os dados levantados nas etapas de avaliação das fontes são constantemente confrontados.

2.2.4 Rastreabilidade

A rastreabilidade metrológica é uma propriedade do resultado de uma medição relacionada à uma referência através de uma cadeia ininterrupta e

documentada de calibrações, onde cada um dos elos contribui para a incerteza de medição (INMETRO, 2008; ELLISON; PASSOS *et al.*, 2018; WILLIAMS, 2012).

A hierarquia do sistema metrológico, como pode ser visto na Figura 6, representa a cadeia de rastreabilidade metrológica que é uma “sequência de padrões e calibrações utilizada para relacionar um resultado de medição a uma referência” (INMETRO, 2012) e possui uma enorme importância, pois mostra a qual referência um resultado de medição é rastreável metrologicamente (DE BIÈVRE, 2010).

Cada nível hierárquico possui uma incerteza cujo resultado é oriundo da soma da sua variação mais a variação da referência a qual se reporta, estabelecendo assim os elos que propiciam a condição de rastreabilidade de uma medida que se propaga cada vez que duas medidas diferentes são postas em condições de comparabilidade, que um material de referência é utilizado ou que um instrumento e/ou equipamento é utilizado.

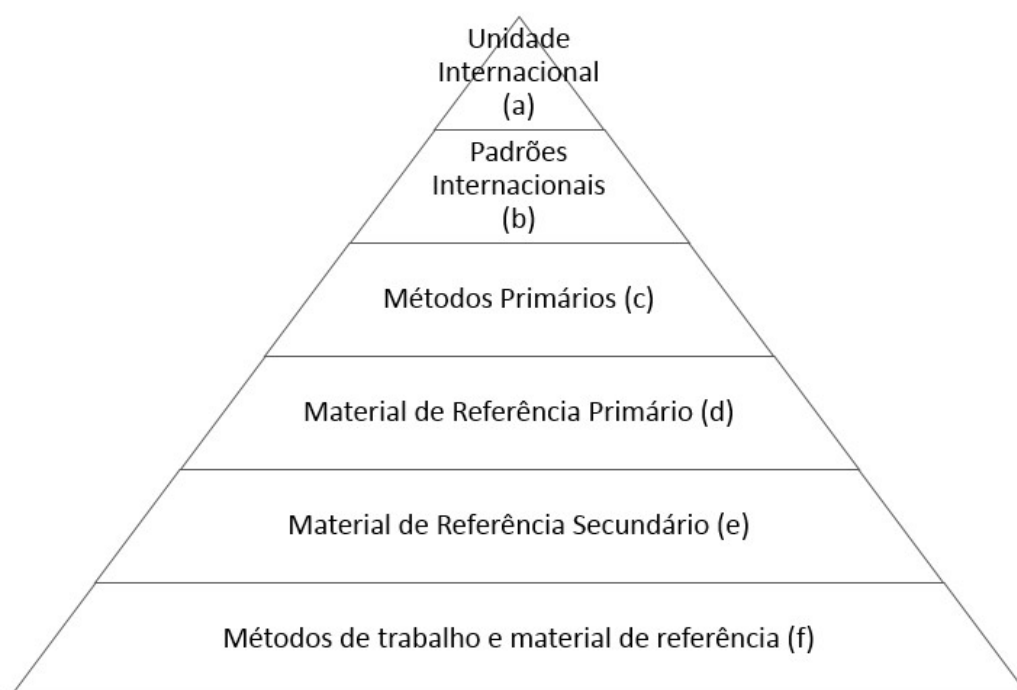


Figura 6 - Hierarquia metrológica
Autor: O próprio (2018)

A relação com cada nível da pirâmide da Figura 6 e o aumento da incerteza associada através da soma de cada uma dessas incertezas conforme um resultado se aproxima da base, pode ser expresso de maneira matemática como nas equações a seguir:

$$u_c = (y(a, b)) = \sqrt{u(a)^2 + u(b)^2} \quad (3)$$

Onde a incerteza combinada do nível **b** $u_c = (y(a, b))$ é a soma da incerteza referência a qual ela se reporta $u(a)$ e da variabilidade intrínseca do nível **b** $u(b)$. Estando assim rastreável ao nível **a**.

$$u_c = (y(b, c)) = \sqrt{u(b)^2 + u(c)^2} \quad (4)$$

Onde a incerteza combinada do nível **c** $u_c = (y(b, c))$ é a soma da incerteza referência a qual ela se reporta $u(b)$ e da variabilidade intrínseca do nível **c** $u(c)$. Estando assim rastreável aos níveis **b** e **a**.

$$u_c = (y(c, d)) = \sqrt{u(c)^2 + u(d)^2} \quad (5)$$

Onde a incerteza combinada do nível **d** $u_c = (y(c, d))$ é a soma da incerteza referência a qual ela se reporta $u(c)$ e da variabilidade intrínseca do nível **d** $u(d)$. Estando assim rastreável aos níveis **c**, **b** e **a**.

$$u_c = (y(d, e)) = \sqrt{u(d)^2 + u(e)^2} \quad (6)$$

Onde a incerteza combinada do nível **e** $u_c = (y(d, e))$ é a soma da incerteza referência a qual ela se reporta $u(d)$ e da variabilidade intrínseca do nível **e** $u(e)$. Estando assim rastreável aos níveis **d**, **c**, **b** e **a**.

$$u_c = (y(e, f)) = \sqrt{u(e)^2 + u(f)^2} \quad (7)$$

Onde a incerteza combinada do nível **f** $u_c = (y(e, f))$ é a soma da incerteza referência a qual ela se reporta $u(e)$ e da variabilidade intrínseca do nível **f** $u(f)$. Estando assim rastreável aos níveis **e**, **d**, **c**, **b** e **a**.

Pode se notar que, quanto mais próximo do topo, mais exato e mais confiável o nível do laboratório, o que também aumenta o custo em infraestrutura metrológica. Quanto mais a cadeia avança se aproximando da base, maior será a incerteza e a variabilidade em torno de um resultado (PEREIRA, 2016).

O conceito de rastreabilidade é mais complexo no caso de medições e análises bioanalíticas uma vez que é difícil estabelecer uma relação direta entre cada grandeza de entrada e o resultado final (BIA, 2009), pois os resultados são oriundos de muitas variáveis e grandezas, sendo necessário que cada valor de entrada tenha sua própria rastreabilidade e a hierarquia envolvida formando uma estrutura ramificada levando em consideração a contribuição relativa para o resultado de medição (INMETRO, 2008).

2.3 AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO

A avaliação da incerteza de medição depende do conhecimento detalhado da natureza do mensurando. A sua qualidade e a utilidade dependem da compreensão, análise crítica e integridade de todos aqueles que contribuem para o estabelecimento do seu valor (INMETRO, 2012)

O processo de avaliação da incerteza de medição consiste na investigação, identificação, quantificação e combinação das fontes de variação que participam de um sistema de medição ou uma metodologia. Compreendendo desde a definição do mensurando (que é onde inicia a intenção de medir) e finalizando com a quantificação da incerteza associada ao resultado.

O processo de avaliação de incerteza pode-se diferenciar de acordo com abordagem adotada e que pode ser afetado com relação às características do processo de medição e do seu mensurando.

2.3.1 Abordagens para a avaliação de incerteza

Existem diferentes abordagens para se estimar a incerteza de medição, cada uma com suas vantagens e desvantagens (Quadro 2). O documento denominado “Avaliação de dados de medição: guia para expressão da incerteza de medição – GUM” é o documento principal para avaliar incertezas, mas a partir dele, diante de diferentes necessidades de aplicação, novas abordagens surgiram com base na sua teoria. Como o *Validation Analytical Measurement* (VAM) (BARWICK, ELLISON, 2000) e o *EURACHEM/CITAC Guide quantifying uncertainty in analytical measurement Third Edition* (QUAM) (ELLISON, WILLIAMS, 2012), que aplicam os princípios do GUM em metodologias analíticas e utilizam dados de validação.

Além disso, foram desenvolvidos modelos preditivos para a estimativa de incerteza como a simulação de Monte Carlo (INMETRO, 2008) a aplicação da estatística Bayesiana (ELSTER *et al.*, 2015) e *Sugorrate Modelling* (PTB, 2016).

Quadro 3 - Diferentes abordagens para estimar incerteza de medição

DOCUMENTOS				
DE REFERÊNCIA	NOME DA ABORDAGEM	PRINCÍPIO BÁSICO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
QUAM e ISO GUM	<i>Bottom-up</i> , erro-budget, propagação de erro considerando a série de Taylor ou componente por componente	Identificação, quantificação e combinação de todas as fontes de incerteza	Holístico. Todas as fontes importantes de incerteza devem ser incluídas.	Complexo e consome tempo.
QUAM, Barwick & Ellison (VAM)	Baseada em validação (<i>Top-down</i>)	Baseada em estudos de validação intra ou interlaboratoriais	Extensão do trabalho da validação, nenhum trabalho extra é necessário	Algumas fontes de incerteza podem ser negligenciadas.
Simulação de Monte Carlo	Modelos preditivos	Simulações estatísticas baseadas em informações de componentes de variação de um sistema de medição	Resulta em uma aproximação da função de distribuição para a variável de saída. Aplicação não depende de realização de testes adicionais	Complexos, exigem um profundo conhecimento de estatística, softwares caros
Estatística Bayesiana				
<i>Sugorrate Modelling</i>				

Fonte: Revisado e adaptado de TAVERNIERS *et al.* (2004)

2.3.1.1 Abordagem *bottom-up*

A abordagem *bottom-up* segue o processo descrito no GUM e seu objetivo é determinar todas as fontes individuais de incertezas $x_1, u(x_1)$; $x_2, u(x_2)$ e $x_3, u(x_3)$ ligadas ao resultado final através de um modelo matemático (figura 7), fornecendo um conjunto de incertezas que são expressas como um desvio-padrão e que combinadas seguindo a lei da propagação de incerteza que está fundamentado na aproximação de primeira ordem da série de Taylor (ROZET *et al.*, 2011; INMETRO, 2012).

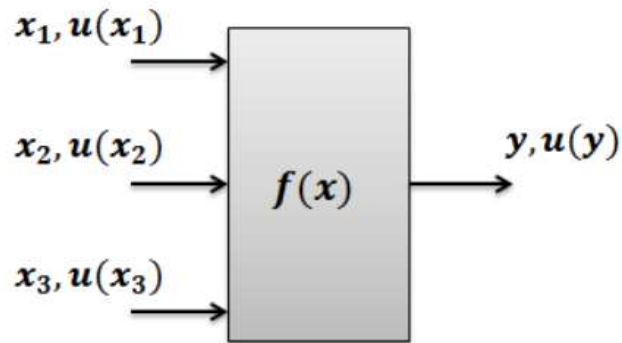


Figura 7 - Esquematização da lei da propagação de incerteza
Fonte: COUTO *et al.* (2013)

Essa abordagem tem a vantagem de identificar e avaliar todas as fontes de incerteza e permite aprimorar o procedimento analítico por reduzir as fontes mais importantes, permitindo também um entendimento detalhado do processo envolvido. Como pode ser visto na figura 8, o princípio desta abordagem admite que todas as fontes podem ser avaliadas de um sistema de medição contribuem para o resultado. Esta abordagem pode ser aplicada não só para avaliação das grandezas como também das etapas de uma metodologia. Tais informações podem ser aproveitadas para melhoria contínua da medição através de controles dessas incertezas (ROZET *et al.*, 2011, WEITZEL, 2014).

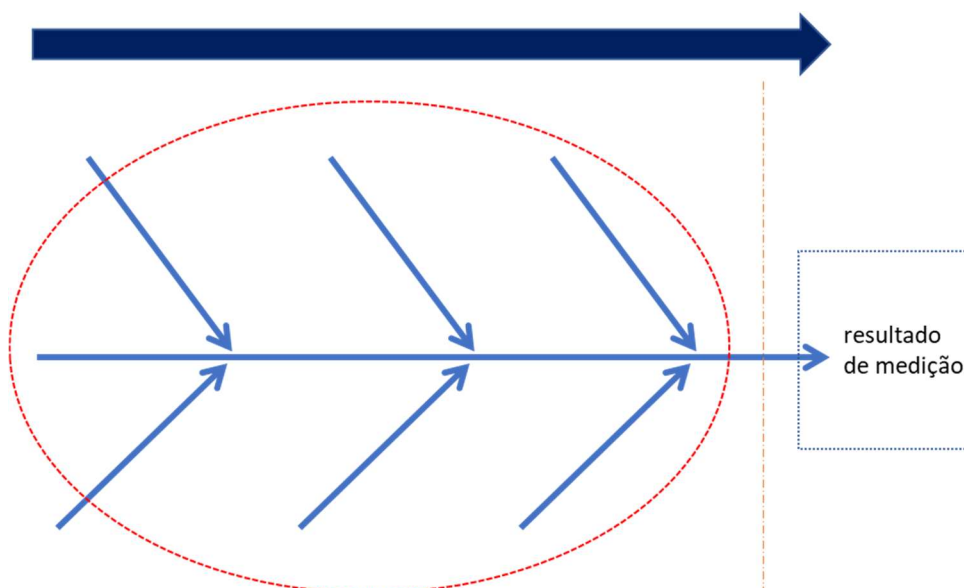


Figura 8 - Abordagem *bottom-up*
Fonte: o autor (2018)

Entretanto, para ROZET *et al.* (2011) a aplicação direta dessa abordagem e dos princípios do GUM em laboratórios bioanalíticos se opõe à competitividade necessária para que os laboratórios se mantenham por ser um trabalho maçante e árduo. Já para TAVERNIERS *et al.* (2004), PEREIRA (2016) a complexidade de implementação está relacionada com a dificuldade de associar todos os componentes que influenciam um ensaio e a falta de conhecimento da estatística e matemática envolvidas na lei de propagação de incerteza, como a utilização de matrizes de covariância, derivadas parciais entre outras estimativas que podem ser aplicadas nesta abordagem.

2.3.1.2 Abordagem *top-down*

A abordagem *top-down* utiliza os dados de vários experimentos como validação, estudos interlaboratoriais e a combinação deles para determinar a incerteza (ROZET *et al.*, 2011). Diferente da abordagem *bottom-up* que sugere que todas as possíveis fontes de incertezas são identificadas, quantificadas e combinadas, a abordagem *top-down* estima diretamente os resultados de incerteza de medição produzidos pelo sistema (PEREIRA, 2016), isto é, todos os componentes individuais de incerteza já foram contribuídos nos experimentos anteriormente citados e também em outros estudos estatísticos.

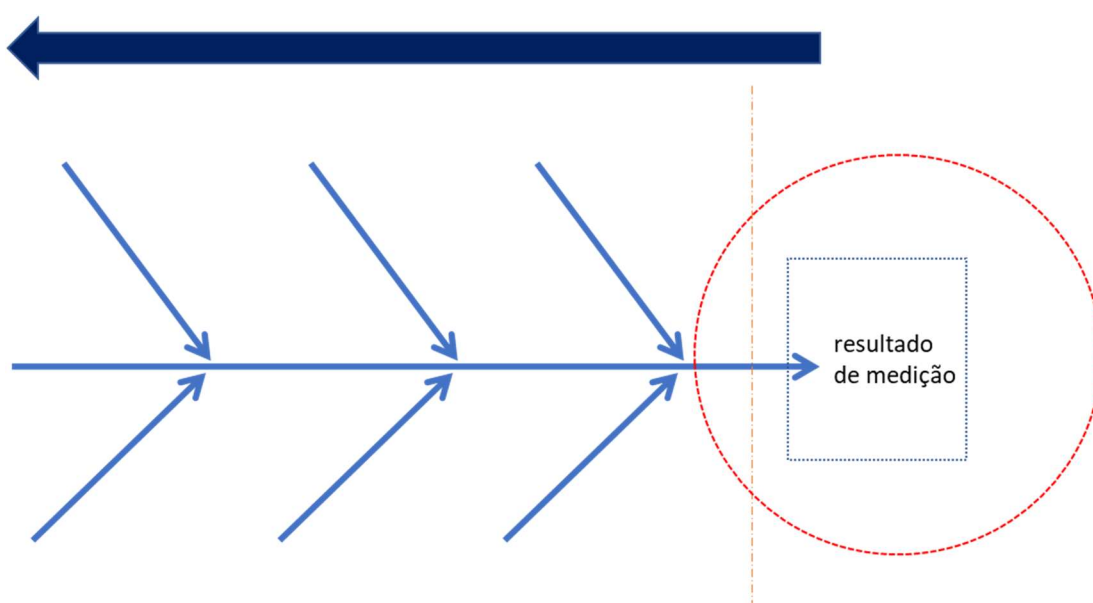


Figura 9 - Abordagem top-down
Fonte: o autor (2018)

De acordo com ROZET *et al.* (2011) essa abordagem permite obter uma incerteza de medição com uma maior relação custo/benefício. A principal vantagem de utilizar esta abordagem é que a estimativa de incerteza passa a ser uma extensão do trabalho de validação de métodos (TAVERNIERS *et al.*, 2004; ELLISON, WILLIAMS, 2012). Entretanto, cabe frisar que para qualquer abordagem selecionada de estimativa da incerteza, o método precisa estar validado para que a incerteza seja representativa (TAVERNIERS *et al.*, 2004; ROZET *et al.*, 2011; ELLISON, WILLIAMS, 2012; WEITZEL, 2014)

3 JUSTIFICATIVA

O Teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise para Febre Amarela em Placas de 96 orifícios (micro-PRNT), objeto deste estudo, é utilizado para avaliação da eficácia da vacina de Febre Amarela atenuada (cepa 17D) e, recentemente, seus resultados têm sido amplamente utilizados para o monitoramento de indivíduos imunizados com as doses de vacinas fracionadas. Os resultados obtidos são definidos como positivos ou negativos de acordo com o ponto de corte do ensaio. A avaliação da incerteza de medição do ensaio como parte do estudo de validação poderá elucidar e caracterizar a zona cinza que é a zona de incerteza onde resultados próximos a este ponto de corte são classificados erroneamente, gerando risco de indivíduos vacinados não-respondedores serem classificados como positivo, proporcionando uma melhoria e confiabilidade aos estudos de avaliação da resposta vacinal. O uso da incerteza para definição da zona cinza seria um incremento para qualidade e confiabilidade dos resultados, sendo algo ainda não implementado, tendo caráter inédito com relação a aplicação e discussão desse tema em nível nacional.

Cabe ressaltar que a estimativa da incerteza de medição para bioensaios é uma área nova e as fontes de incertezas e as abordagens não foram estudadas tanto quanto nas medições físicas e químicas, e há um esforço internacional de alcançar qualidade em biomedicações através da aplicação dos princípios metrológicos. Este é o primeiro trabalho a aplicar os princípios dos guias de incerteza de medição (GUM/BIPM) e o guia de incerteza de medição analítica (QUAM/EURACHEM), e também é o segundo trabalho que discute o uso da incerteza de medição no ensaio PRNT em todo o mundo (SALJE *et al.*, 2014) e também é o segundo a utilizar a incerteza para caracterização da zona cinza (PEREIRA *et al.*, 2016).

O resultado deste trabalho pode contribuir para proposição de mudanças na legislação sanitária, pois ainda que a informação da incerteza proporcione qualidade e confiança a um resultado de medição, a avaliação da incerteza não é um parâmetro preconizado pela ANVISA durante os estudos de validação na indústria farmacêutica de acordo com as legislações vigentes, como a RE 166/2017 para métodos físico-químicos e para ensaios biológicos de acordo com a RDC 27/2013.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar a zona cinza do ensaio micro-PRNT para o vírus da Febre Amarela através da avaliação da incerteza de medição aplicada a bioensaios visando elaborar um algoritmo decisório para estabelecer critérios para repetição do ensaio e indicação da revacinação.

4.1.1 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) Identificar as fontes de incerteza do ensaio micro-PRNT – abordagem *bottom-up* (GUM).
- b) Avaliar a incerteza de medição de um soro *in-house* calibrado contra um soro de referência internacional – abordagem *bottom-up* (GUM).
- c) Avaliar a incerteza de medição do ensaio utilizando os dados de validação e de outros estudos – abordagem *top-down* (QUAM).
- d) Caracterizar a zona cinza para os resultados expressos em miliunidades internacionais por mililitros.
- e) Elaborar um algoritmo decisório para estabelecer critérios para repetição do ensaio e indicação da revacinação para os resultados quantificados na região da zona cinza.

5 MATERIAL E MÉTODO

A avaliação da incerteza de medição foi aplicada no teste micro-PRNT de febre amarela, que tem como objetivo determinar o título de anticorpos neutralizantes em soro. Este ensaio foi realizado no Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV), pertencente a Vice-diretora de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC) de Bio-Manguinhos e a avaliação dos dados e os cálculos estatísticos foram realizados pela Seção de Validação Analítica (SEVAN) pertencente ao Laboratório de Metrologia e Validação (LAMEV) / Departamento de Garantia da Qualidade (DEGAQ).

5.1 TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO POR MEIO DA REDUÇÃO DE PLACAS DE LISE PARA FEBRE AMARELA EM PLACAS DE 96 ORÍFÍCIOS.

5.1.1 Descrição da metodologia

Para realização do teste a primeira etapa do ensaio consistiu na diluição dos soros amostrais no fator 2 iniciando em 1:5 e terminando em 1:640, esta diluição foi realizada em meio de cultivo 199 (suplementado com antibiótico e Fungizona) em placas de 96 orifícios. A etapa subsequente foi a etapa de neutralização, na qual foram adicionados 50 µl/orifício de suspensão viral em uma concentração fixa, previamente determinada para que se obtenha em torno de 30 placas de lise por orifício. Nesta etapa as placas foram incubadas por uma hora em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Após este período, adicionou-se 50 µL/orifício de suspensão celular (preparada imediatamente antes do uso, com uma concentração de 1,6 x 10⁶ células/mL) em todos os orifícios da placa. Logo em seguida, foi levada para incubação por 3 horas a 37 °C com 5% de CO₂, esta etapa é denominada de adsorção. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 100 µL/orifício de meio semissólido de carbometilcelulose (CMC) a 2,5% foi adicionado. Nesta etapa a intenção é delimitar os plaques produzidos pelos vírus que não foram neutralizados pelo soro. A etapa seguinte é a Incubação por seis dias em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Este tempo é o necessário para permitir que as partículas virais entrem na célula e se repliquem levando à lise celular e, por conseguinte o aparecimento dos plaques. Após os seis dias de incubação as monocamadas celulares foram fixadas por pelo menos três horas com uma solução de formaldeído a 5%. Após a etapa de fixação as placas foram lavadas para retirada do CMC e coradas com cristal violeta 0,04% para posterior

contagem das placas de lise. Para quantificação dos anticorpos o primeiro passo foi a contagem do controle viral. Os poços que continham apenas células e vírus, tiveram seus plaques contados e em seguida fez-se a média do número de plaques. Para determinação do *endpoint*, a média dos plaques foi dividida por 2. O título de anticorpos neutralizantes das amostras foi determinado como a diluição do soro que foi capaz de reduzir em 50% o número de placas de lise obtidas no controle viral. O resultado é obtido por regressão linear do número de plaques de lise do soro amostral imediatamente acima e abaixo do *endpoint* previamente determinado (metade, ou seja, 50% da média aritmética obtida a partir das réplicas destinadas ao controle de vírus). Os resultados (títulos de anticorpos neutralizantes para febre amarela) foram expressos em \log_{10} de mUI/mL e \log_{10} de 1:D.

Exemplo: se em 1 coluna do controle viral o número de plaques for 50, 40, 40, 45, 35, 50, 30 e 30

Calcula-se a média: = 40

Divide-se essa média por 2 = 20 – Este será o *endpoint* do teste quando trabalhar com o PRNT50.

Para cálculo do título da amostra contou-se o número de placas em todas as diluições até atingir o *endpoint* e, quando atingiu-se uso-se a diluição imediatamente acima e abaixo para cálculo do título.

Exemplo : Dil 1:5 - 2 plaques

Dil 1:10 – 5 plaques

Dil 1:20 – 10 plaques

Dil 1:40 – 15 plaques

Dil 1:80 – 20 plaques

Dil 1:160 – 25 plaques

Dil 1:320 – 30 plaques

Dil 1:640 – 40 plaques

A regressão linear será
entre as diluições 1:40 e 1:160

5.1.2 Instrumentos/Equipamentos utilizados no ensaio

- Pipetas graduadas estéreis Costar (1 mL, 5 mL, 10 mL e 25mL).
- Pipetas monocanais Gilson/Pipetman de (100-1000) μ L.
- Pipetas monocanais Thermo/Finnpipette de (50-200) μ L.
- Pipetas monocanais Gilson/Pipetman (50-20) μ L.

- e) Pipetador multicanal Thermo/Finnpipette F1 (30-300) μ L.
- f) Câmara de Neubauer.
- g) Proveta.
- h) Microscópio óptico invertido Leica.
- i) Capela de fluxo laminar VECO.
- j) Incubadora *Series II Water Jacket Thermo Scientific* modelo 3111 com 5% de CO₂.

5.1.3 Materiais utilizados nos ensaios

- a) Meio de cultura 199, com sais de Earle - Fabricante: Life Technologies.
- b) HEPES 1M - Fabricante: Sigma Aldrich.
- c) Soro Fetal Bovino Fabricante: Gibco.
- d) Solução de Bicarbonato de Sódio gaseificado 4,4% - Fabricante Merck.
- e) Sulfato de Gentamicina - Fabricante: Hypofarma (4,0 mg/mL).
- f) Anfotericina B (Fungizona 250 μ g/ml) - Fabricante: Gibco.
- g) Carboximetilcelulose (CMC) 3% - Fabricante: Sigma Aldrich.
- h) Solução de Cristal Violeta 0,04%.

5.1.4 Soros amostrais

Foram utilizados os soros provenientes do estudo intitulado “Protocolo para Obtenção e Produção de Soros *In-House* para Testes de Neutralização por Redução de placas de Lise (PRNT)”, aprovado pelo CEP SMS – RJ em 08 de julho de 2013 (CAAE 15120613.4.0000.5262). Este foi um estudo realizado em amostras de 300 voluntários adultos, entre 18 e 60 anos, de ambos os sexos, que receberam anteriormente uma ou mais doses da vacina antiamarílica e/ou tiveram a doença e/ou estiveram em área endêmica da doença. Tendo por objetivo a produção de soros padrões *in-house* que contenham altos títulos de anticorpos neutralizantes; a produção de diferentes *pools* de soros positivos e negativos para a presença de anticorpos e a realização do PRNT para a quantificação de anticorpos neutralizantes. A utilização desses soros foi autorizada pela Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC/FIOCRUZ).

Os soros amostrais testados neste trabalho foram previamente submetidos a uma temperatura de 56 °C por 30 minutos visando a inativar o complemento e outros componentes séricos com ação neutralizante inespecífica.

5.1.5 Soros padrão internos (controles positivos e negativos)

Como controle positivo: No ensaio de caracterização do soro *in-house* foi utilizado o Soro Referência Internacional do *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC) *Yellow Fever* (YF) diluído 1:10 / 14300 *mUI/mL* como controle positivo. Após a calibração do soro *in-house* o mesmo foi utilizado como controle positivo nos estudos de validação.

O controle negativo: Soro negativo para presença de anticorpos neutralizantes para febre amarela.

Todos os soros padrões internos foram previamente inativados e estocados a 20 °C até a realização dos testes.

5.1.6 Vírus

Foi utilizado vírus obtido a partir do Banco de Trabalho do LATEV Lote #002/16 – Subcepa 17D-213/77, produzido (clarificado) em março/2016; originado do Banco Master (produzido em Out/2014, a partir do lote #11UEXVFB01 – dez/2011).

Uma alíquota do vírus da Febre Amarela cepa 17D que estava armazenada em um freezer -70°C foi descongelada em água corrente e submetida à diluição 1:5000 para que se obtenha uma média de 30 placas de lise (faixa de aceitação 20-60 PFU/orifício). Com exceção dos orifícios destinados ao controle de células (linhas colunas 1 e 12), 50 µL de suspensão viral, foram aplicados em todos os orifícios da placa.

5.1.7 Cultura de células

Foram utilizadas células da coleção *American Type Culture Collection* (ATCC) CCL-81. Esta linhagem de celular Vero foi iniciada a partir do rim de um macaco verde africano adulto (*Cercopithecus aethiops*). Foi separado um número de garrafas de cultura das referidas células suficiente para obter uma suspensão com $1,6 \times 10^6$ células/mL.

5.2 AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO DO TESTE MICRO-PRNT

A avaliação da incerteza de medição foi realizada utilizando a abordagem *top-down* (QUAM) com base na avaliação dos dados de validação e de outros estudos realizados pelo LATEV conforme o quadro. Entretanto, tanto os guias QUAM e GUM foram utilizados durante a avaliação da incerteza. Para fins regulatórios, o ensaio foi validado de acordo com a RDC 27/2012 seguindo o protocolo de validação aprovado pela SEVAN e elaborado em colaboração com o LATEV. Neste protocolo os resultados foram expressos em \log_{10} mUI/mL.

Dos testes requeridos para condução da validação de acordo com a legislação, não foram realizados os testes de efeito residual, efeito matriz e curva analítica, pois são testes voltados para ensaios bioanalíticos instrumentais. Além do mais, a realização de uma curva padrão não faz parte do princípio do método micro-PRNT. Discussões referentes às diferentes abordagens de validação aplicada a bioensaios e as questões regulatórias e científicas relacionados ao PRNT foram amplamente discutidas por FIGUEIREDO *et al.* (2016).

Para calcular a incerteza em mUI/mL foram utilizados os testes realizados de acordo com os requisitos regulatórios, também foi considerado o teste de robustez, pois é um teste que fornece informações das variabilidades referentes a alteração em etapas do ensaio. Os dados da robustez originalmente estavam em recíproca da diluição, mas foram convertidos para mUI/mL.

Quadro 4 - Estudos avaliados para estimativa da incerteza

Teste	grandeza	Atende a requisitos	Crêterios
Precisão intracorrıda e intercorrıda	mUI/mL	Regulatórios (RDC 27/2012)	≤ 20%
	1:x	Literatura científica e critérios do laboratório	
Exatidão intracorrıda e intercorrıda	mUI/mL	Regulatórios (RDC 27/2012)	≤ 15%
	1:x	Literatura científica e critérios do laboratório	Diferença absoluta ≤ 0,477
Teste de seletividade	mUI/mL	Regulatórios (RDC 27/2012)	
	1:x	Literatura científica e critérios do laboratório	
Teste de Robustez	mUI/mL	Literatura científica e critérios do laboratório	
	1:x		

Os guias QUAM e GUM foram utilizados para a avalia o da incerteza do micro-PRNT que foram sumarizadas de acordo com as seguintes etapas:

Etapa 1 – Defini o do mensurando

Etapa 2 – Identifica o das fontes de incerteza

Etapa 3 – Quantifica o das fontes de incerteza

Etapa 4 – Determina o da incerteza combinada e expandida

5.2.1 Etapa 1 - Defini o do mensurando

Foi realizada, conforme o GUM, uma apresenta o do problema de medi o, isto  , o contexto pela qual a medi o ocorre, a sua modelagem matem tica, convers o de unidades e as etapas que envolvem a determina o anticorpos neutralizantes anti-FA. e a distribui o presumidas e assumidas dos resultados.

5.2.2 Etapa 2 - Identifica o das fontes de incerteza

Foi realizado um fluxograma com as etapas do processo de medi o onde cada uma delas foi classificada como impacto direto ou indireto na qualidade do ensaio, tomando por refer ncia a rela o com o modelo matem tico para obten o do resultado em rec proca da dilui o e mUI/mL. As etapas classificadas como impacto direto foram estruturadas em um diagrama de causa e efeito (Figura 10), que   uma ferramenta que tem o objetivo de relacionar as fontes de incerteza que impactam o resultado de medi o (INMETRO, 2012; ELLISON, WILLIAMS, 2012), para identificar e listar as fontes de incerteza (u_1, u_2, \dots, u_N) . O eixo horizontal   a

variável de saída (*output*) que será analisada e os eixos diagonais são as variáveis de entrada (*input*).

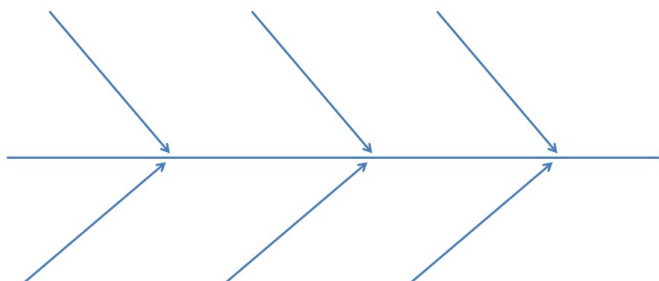


Figura 10 - Diagrama de Causa e Efeito
Fonte: o autor (2018).

A estratégia para identificação usando esta ferramenta seguiu pelo menos dois estágios (ELLISON, WILLIAMS, 2012):

- identificação dos efeitos no resultado através de uma listagem de todas as possíveis fontes de variabilidade;
- simplificação e resolução das duplicações: que consiste em apresentar de maneira simples a lista inicial de fontes de incerteza em relação ao modelo matemático ou aos dados obtido em estudos de validação.

5.2.3 Etapa 3 – Quantificação das fontes de incerteza

5.2.3.1 Incerteza obtida no teste de precisão (precisão intracorrída e intercorrída)

A incerteza associada a repetitividade foi obtida a partir dos resultados do teste de precisão, que foi determinada em uma mesma corrida (precisão intracorrída) e em 3 corridas diferentes (precisão intercorrídas). Foram analisados 16 soros em três níveis de concentrações de anticorpos anti-FA (4 soros altos, 6 médios e 6 baixos) em três dias: dia 1 - operador A; dia 2 - operador A; dia 3 - operador B.

Cada componente de incerteza obtida no teste de precisão (figura 11), foi avaliado como uma incerteza tipo A, pois foram obtidos estatisticamente. O desvio padrão obtido no teste de precisão foi dividido pela raiz do número de repetições devido à normalidade atribuída ao conjunto de dados.

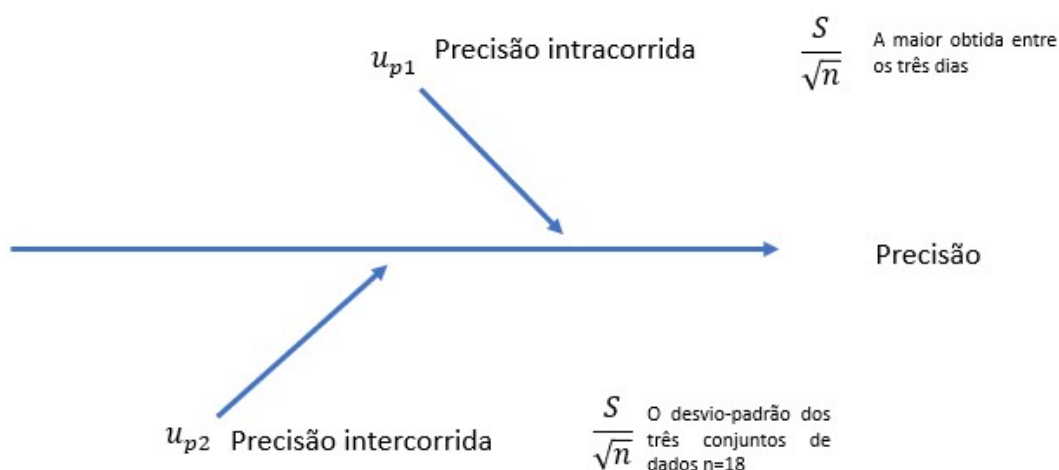


Figura 11 - Diagrama de causa-e-efeito para o teste de precisão
 Fonte: o autor (2018)

A incerteza associada a precisão foi calculada para cada um dos 16 soros analisado. Entretanto, foi utilizado o pior caso da incerteza intracorrída e intercorrída para ser combinado as demais fontes de incerteza da metodologia.

5.2.3.2 Incerteza obtida no teste de exatidão (exatidão intracorrída e intercorrída)

A incerteza associada a tendência foi obtida a partir dos resultados do teste de exatidão, que foi determinada em uma mesma corrida (exatidão intracorrída) e em 3 corridas diferentes (exatidão intercorrídas). Foi analisado um soro in-house com concentração de anticorpos neutralizantes anti-FA conhecido, que foi previamente calibrado e padronizado frente a um soro de referência internacional anti-Febre Amarela diluído 1:10 / 14300 mUI/mL .. Este soro foi analisado em quintuplicata não diluído e diluído nas seguintes “concentrações” 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 em três dias diferentes: dia 1 - operador A; dia 2 - operador A; dia 3 - operador B.

Na literatura científica, a incerteza relacionada a exatidão é avaliada considerando os seguintes componentes: repetitividade, incerteza do material de referência e a tendência, isto é, a diferença entre o valor de referência e o valor obtido. Entretanto, neste trabalho, a incerteza associada a repetitividade na exatidão não foi considerada, pois este componente foi extensivamente testado, avaliado e já foi combinada a incerteza obtida no estudo de precisão.

Sendo assim, foram considerados como fontes de incerteza do teste de precisão (figura 12), o componente de incerteza relacionada ao erro relativo (u_{e1}), para os dados expressos mUI/mL e a incerteza do material de referência biológico (u_{e2})

que foi obtido através dos dados referentes a calibração do soro in-house contra um Soro Referência Internacional do NIBSC anti-Febre Amarela diluído 1:10 / 14300 mUI/mL .

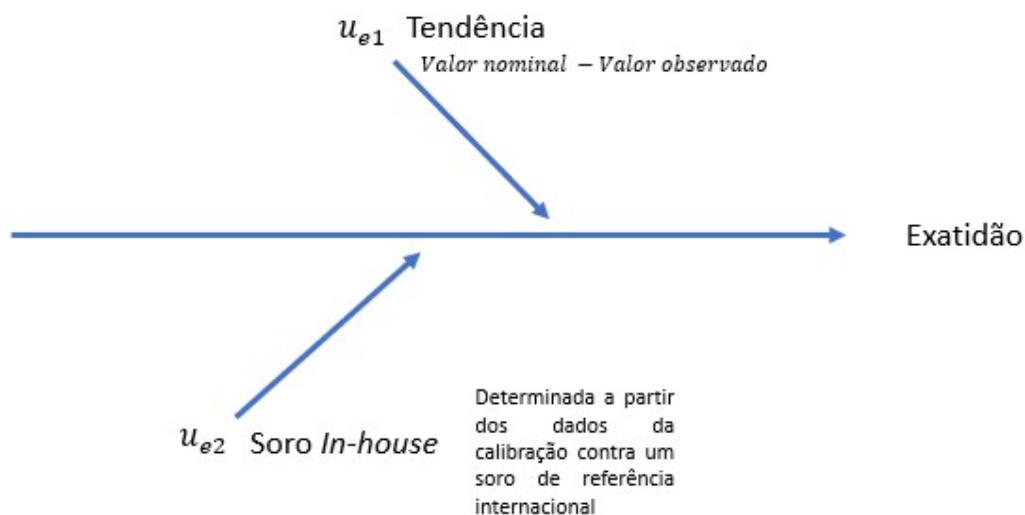


Figura 12 - Diagrama de causa-e-efeito para o teste de exatidão
Fonte: o autor (2018)

5.2.3.2.1 - A avaliação da incerteza da calibração do soro *in-house* (u_{e3})

O valor do soro *in-house* em mUI/mL foi obtido a partir da realização de três ensaios realizados em dias distintos, onde em cada ensaio este soro foi dosado dez vezes ($n=10$) e o soro de referência foi dosado três vezes, seguindo procedimento do laboratório. O título em recíproca da diluição foi convertido em mUI/mL , e o valor nominal foi obtido através da média geométrica dos resultados dos três ensaios ($n=30$). A incerteza associada ao valor do soro *in-house* calibrado foi determinado como resultado da soma das variações que ocorreram dentro de cada um dos três ensaios.

$$u_{e3}^2(y) = u_{dia1}^2 + u_{dia2}^2 + u_{dia3}^2 \quad (08)$$

- Avaliação da incerteza tipo A

A incerteza tipo A foi obtida da análise estatística de uma série de observações. É a incerteza referente ao tamanho da amostra e a sua estimativa depende da função de distribuição de probabilidade do mensurando. Para aqueles

que apresentaram normalidade na distribuição, a incerteza tipo A foi o desvio padrão amostral sobre raiz do número de medições:

$$u_a = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (09)$$

- Avaliação da incerteza tipo B - volume

A incerteza do volume foi determinada através da incerteza relativa, que consiste na razão da incerteza e medida que está relacionada, combinando a incerteza da micropipeta u_{pipeta} e o valor do erro u_{erro} , quando o mesmo não foi corrigido durante o ensaio. Onde V_x é o volume de dispensado e u_{v_x} e a incerteza combinada de um dado volum utilizado no ensaio.

$$u_{v_x} = \sqrt{\left(\frac{u_{\text{pipeta}}}{V_x}\right)^2 + \left(\frac{u_{\text{erro}}}{V_x}\right)^2} \quad (10)$$

- Avaliação da incerteza tipo B - certificados de padrões e materiais de referência

A incerteza do certificado de calibração de pipetas e de matérias de referência é o valor da incerteza expandida apresentada no certificado dividido pelo valor de k descrito no certificado. O soro de referência padrão não apresenta uma incerteza referente ao valor declarado a incerteza, o que é comum na área biológica.

Os soros anti-Febre Amarela contém 143 UI/mL por ampola e foi submetido a uma diluição 1:10 obtendo assim 0,143 UI/mL, sendo assinado no ensaio como 14300 mUI/mL. Como o certificado não apresenta uma incerteza associada ao título de anticorpos neutralizantes, o GUM (INMETRO, 2012) permite que a incerteza seja obtida de maneira empírica, este tipo de incerteza é uma incerteza do tipo B. Foram avaliadas cinco possíveis variações percentuais (2,5%, 5%, 10%, 20% e 30%) em torno do valor de referência no ensaio (14400 mUI/mL).

Cada variação foi tratada com uma densidade de probabilidade quadrática (distribuição retangular). As incertezas do soro *in-house* foram calculadas para cada uma dessas variações teóricas e discutida com relação a rastreabilidade de materiais de referências biológicos, principalmente com relação aos padrões de anticorpos e soros utilizados em estudos de vacinas.

- Quantificação das fontes de incerteza

Após a identificação das variáveis conforme, cada uma das fontes de incerteza foi avaliada e quantificada a fim de determinar u_1, u_2, \dots, u_N . A quantificação

dessas fontes dependerá de sua origem e foi realizada de duas formas: determinado o coeficiente de sensibilidade ou por incerteza relativa

O coeficiente de sensibilidade $\left(\frac{df}{dx_i}\right)$ é a derivada parcial da função $Y = f(X_1, X_2, \dots, X_N)$ que modela o mensurando em relação a grandeza de entrada x_i .

A determinação da incerteza relativa é a razão entre valor da incerteza sobre o valor da medida e o valor da grandeza relacionada.

- Determinação da incerteza combinada

A incerteza combinada $u_c^2(y)$ é determinada pela equação chamada de Lei de Propagação de Incertezas. Trata-se da soma quadrática dos produtos entre as incertezas de cada componente de entrada e seu respectivo coeficiente de sensibilidade $\left(\frac{df}{dx_i}\right)$, que é derivada parcial da função que modela o resultado do mensurando.

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^N \left(\frac{df}{dx_i}\right)^2 u^2(x_i) \quad (11)$$

- Determinação do grau de liberdade efetivo e do fator de abrangência

A seleção do fator de abrangência k é realizada com base no nível de confiança requerido para a incerteza e no grau de liberdade efetivo v_{eff} através da equação de Welch-Satterthwaite a seguir:

$$v_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{v_i}} \quad (12)$$

Onde,

v_{eff} é o grau de liberdade efetivo

$u_c(y)$ é a incerteza combinada

$u_i(y)$ é a incerteza-padrão de cada fonte de entrada na unidade do mensurando;

v_i é o grau de liberdade de cada fonte de entrada

Uma vez determinado o grau de liberdade, o fator de abrangência foi selecionado para obtenção de uma incerteza com a probabilidade requerida conforme o apêndice A que é baseado na distribuição t-STUDENT (INMETRO, 2012).

- Determinação da incerteza expandida

Embora a incerteza combinada $u_c^2(y)$ possa ser universalmente usada para expressar a incerteza de um resultado de medição, este trabalho utilizou uma probabilidade de 90% com base no modelo abaixo:

$$U = ku_c(y) \quad (13)$$

Onde U é a incerteza expandida; $u_c(y)$ é a incerteza combinada de y , obtida pela raiz da variância combinada calculada na equação e k é o fator de abrangência determinado com base no grau de liberdade efetivo e no nível de confiança requerido.

5.2.3.3 Incerteza associada ao teste de seletividade

Foi realizada uma avaliação e discussão dos resultados com relação a variação dos resultados obtidos no teste de seletividade com o objetivo de avaliar a incerteza associada a influência da presença de anticorpos neutralizantes de outros flavivírus presente em soro amostral positivo para Febre Amarela (Figura 13). O teste foi realizado diluindo amostras positivas anti-FA em diferentes soros: soro negativo para Febre Amarela, soro positivo para Dengue e soro positivo para Zika. A diferença absoluta entre o soro positivo para Febre Amarela diluído em um soro negativo e, este mesmo soro positivo para Febre Amarela diluído em soro positivo para os flavivírus Dengue e Zika não deve ser maior que três vezes, o que matematicamente em \log_{10} significa que a diferença não pode ser maior que 0,477.

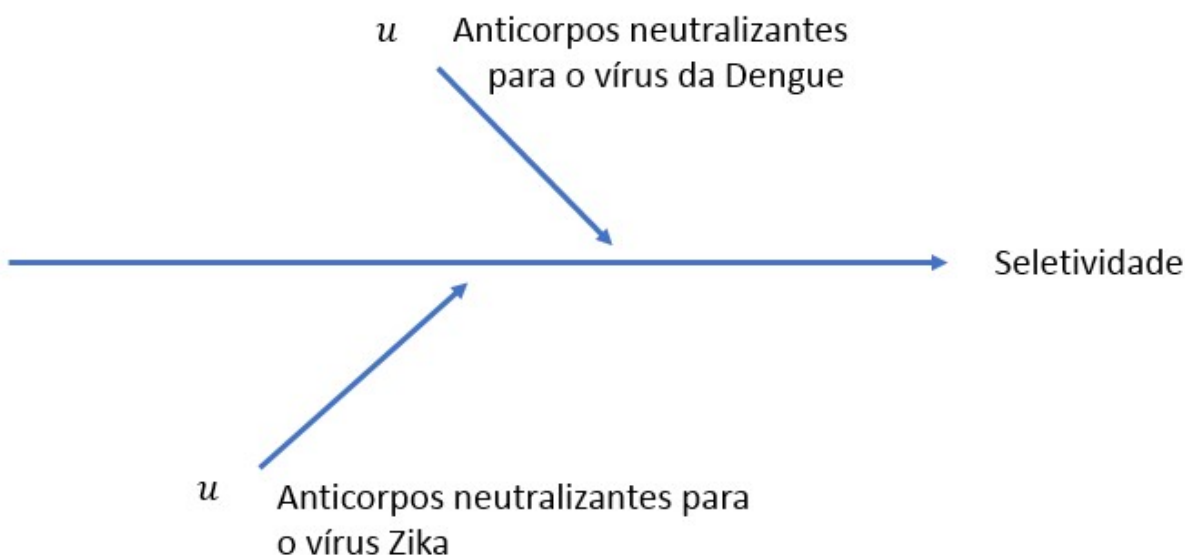
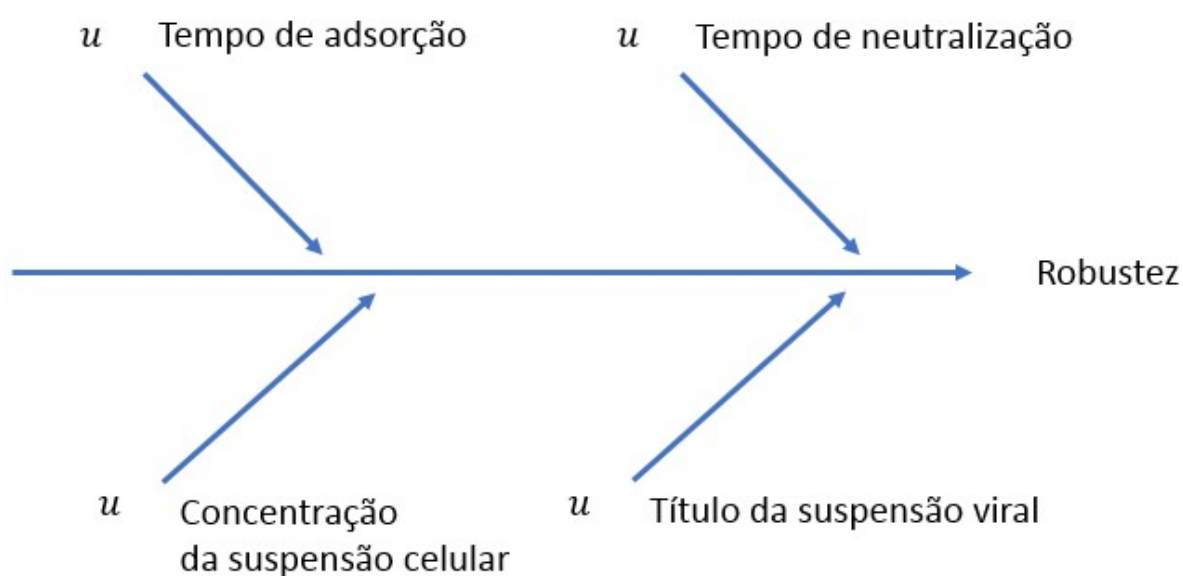


Figura 13 - Diagrama de causa-e-efeito para o teste de seletividade
Fonte: o autor (2018)

5.2.3.4 Incerteza associada ao teste de robustez

Durante o teste de robustez realizado pelo laboratório, foram analisados três soros em três corridas distintas para avaliação de cada uma das influências de incerteza do tipo B, que estão relacionados ao princípio da metodologia (Figura 14). Estes componentes de variação que não foram obtidos por métodos estatísticos, sendo avaliados comparando os resultados obtidos pelo método padrão com o resultado das modificações conforme os critérios do quadro 3. Foram realizadas duas modificações por fonte de influência, sendo que para avaliação da influência do fator de diluição da suspensão viral foi utilizado o fator 1:5000 ao invés de 1:5500.



Fonte: o autor (2018)

Figura 14 - Diagrama de causa-e-efeito para o teste de robustez

Foi calculado a diferença absoluta em log entre o resultado do método padrão e o título obtido no método modificado. A diferença entre títulos, no teste de robustez, não deveria ser maior que três vezes o resultado obtido no método em sua condição padrão, o que matematicamente significa que entre os resultados transformados em log não deve haver uma diferença máxima de 0,477.

Tabela 1 - Condições estabelecidas para o método modificado para avaliar a Robustez

Influências das incertezas tipo B u_B	Método	Modificações		
	Padrão			
Tempo de neutralização	1 hora	45 minutos	1 hora e 15 minutos	
Tempo de adsorção da monocamada	3 horas	2 horas e 30 minutos	3 horas e 30 minutos	
Fator de diluição da suspensão viral*	1:5500	1:10000	1:5000*	1:2500
Concentração de células da suspensão celular	1.600.000 células por mililitros	800.000 células por mililitro	3.200.00 células por mililitros	

Fonte: o autor (2018).

5.2.4 Etapa 4 – Determinação da incerteza combinada e expandida

A incerteza combinada $u_c^2(y)$ foi determinada pela soma quadrática das maiores incertezas obtidas durante os estudos de validação. Esta foi a incerteza definida para expressar o resultado do método micro-PRNT. A incerteza do método foi expandida à um nível de probabilidade de 95,45% através da multiplicação da incerteza combinada por um fator de abrangência igual a 2,00.

5.3 DETERMINANDO A ZONA CINZA DO ENSAIO: AVALIAÇÃO DA INCERTEZA NA LINHA DE CORTE

A zona cinza foi determinada e discutida aplicando a incerteza combinada do método, estimada pela incerteza combinada expandida a um nível de probabilidade de 95,45%, ao cutoff do ensaio que é 794 mUI/mL para o resultado em concentração de anticorpos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ETAPA 1 - DEFINIÇÃO DO MENSURANDO

Os resultados de medição avaliados neste trabalho foram obtidos a partir da regressão linear entre a contagem PFU imediatamente inferior e superior ao *endpoint* do teste, determinado pelo controle viral no dia do ensaio, e as suas respectivas diluições. Uma vez determinado os títulos das replicatas do controle positivo, foi estimada a sua média geométrica.

Por conseguinte, determinado o quociente entre o valor nominal da concentração de anticorpos declarado na instrução de uso do soro de referência anti-FA, que foi submetida a uma diluição 1:10 no ensaio, e o seu título em recíproca da diluição no ensaio (figura 15), que foi multiplicado pelos títulos em recíproca da diluição dos soros testados nos experimentos de calibração do soro *in-house* e os testes de validação. Durante os testes de validação o soro *in-house* foi utilizado como controle positivo.

$$\begin{array}{ccc}
 \boxed{1} & EP50 = \frac{\bar{x}_v}{2} & \\
 \swarrow & & \searrow \\
 \boxed{2} & t_{EP50} = \frac{EP50 - a}{b} & \boxed{3} \\
 & & t_{sp} = \frac{EP50 - a}{b} \\
 \swarrow & & \searrow \\
 \boxed{4} & T_{mUI/mL} = t_{EP50} \times \frac{T_{rs \text{ mUI/mL}}}{t_{rs}} &
 \end{array}$$

Figura 15 - Cálculos para determinação de anticorpos neutralizantes

O nível de anticorpo expressos em recíproca da diluição, uma grandeza adimensional obtida a partir da razão entre dois números com a mesma unidade (grandeza volume) indica a diluição cuja presença de anticorpos é capaz de neutralizar 50% da atividade viral. Isto é, uma amostra dosada até a diluição

determinada por sua recíproca apresentará atividade neutralizante contra o vírus da Febre Amarela. A recíproca da diluição é a resposta direta do ensaio.

A conversão dos resultados do teste micro-PRNT para concentração de anticorpos se dá pelo uso de um soro de referência internacional anti-Febre Amarela que é preconizado pela OMS (2009) com objetivo de alcançar comparabilidade entre os resultados de imunogenicidade. Como a quantidade do soro padrão é limitada, cada laboratório prepara seu próprio soro *in-house* calibrando o seu valor com o soro de referência para que o mesmo seja utilizado para converter os resultados de soros amostrais, em estudos de validação e na própria rotina como controle positivo. Essa cadeia de medições atrelada a uma referência estabelece o conceito de rastreabilidade metrológica nas medições conforme a figura 16.

Matematicamente falando, a conversão dos resultados em recíproca da diluição para UI/mL é calculada dividindo a concentração de anticorpo soro internacional presente na instrução de uso, ou de um soro *in-house* caracterizado, pelo seu título em recíproca da diluição no EP50 e depois multiplicando o seu quociente pelo título do soro amostral (COHEN *et al.*, 2007).

No teste micro-PRNT os resultados foram expressos na unidade mUI/mL, pois o soro de referência, cuja ampola contém 143 UI/mL, é submetido a uma diluição 1:10 obtendo assim 14,3 UI/mL ou 14300 mUI/mL.

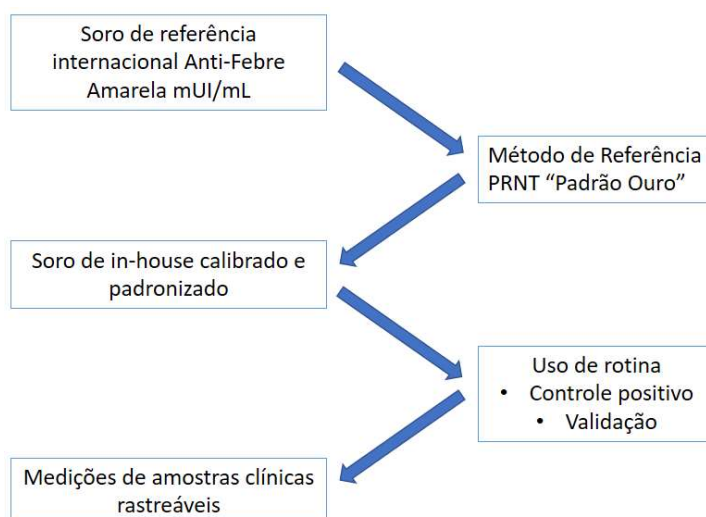


Figura 16 - Rastreabilidade das medições de concentração de anticorpos neutralizantes anti-

FA

A distribuição dos resultados obtidos da imunogenicidade humoral pós-vacinação, de acordo com NEUTA (2009), tende a se comportar de maneira assimétrica à direita enquanto os resultados quando transformados em log são aproximadamente normalmente distribuídos, caracterizando assim uma distribuição log-normal. Por isso, resultados de estudos clínicos em vacinas são tratados sob a forma de log, com a finalidade de melhorar a interpretação, adquirir normalidade e facilitar a interpretação dos resultados (NEUTA, 2009; ARMITAGE *et al.*, 2002). Os dados transformados em log são utilizados em estudos de validação para melhor interpretação dos resultados (FIGUEIREDO, 2015)

No ponto de vista estatístico, quando variáveis são estritamente positivas e apresentam uma grande variação em seus resultados, sua assimetria tende a ser positiva, isso ocorre em métodos de determinação de concentração de substância químicas ou biológicas em amostras de sangue, soro ou urina (ARMITAGE *et al.*, 2002). Entretanto, a assimetria do conjunto de dados é algo comum nas distribuições normais.

6.2 ETAPA 2 - IDENTIFICAÇÃO DAS FONTES DE INCERTEZA

Com base na avaliação da instrução de trabalho e no acompanhamento do ensaio, foi construído um fluxograma do processo de medição com as etapas e as suas respectivas grandezas de entrada (Figura 17). As etapas estruturadas no fluxograma foram categorizadas como pré-analítica que é etapas referente ao tratamento da amostra, etapa analítica onde os procedimentos necessários para obtenção do resultado são executados e pós-analítica que é referente a determinação do resultado propriamente dito.

Cada uma das etapas do fluxograma foi classificada como impacto direto e indireto para diferenciar as variáveis que afetam as entradas da modelagem matemática como por exemplo, a determinação da concentração celular e a concentração viral que são importantes para que a contagem de plaques por orifício não fique saturada dificultando assim a sua leitura.

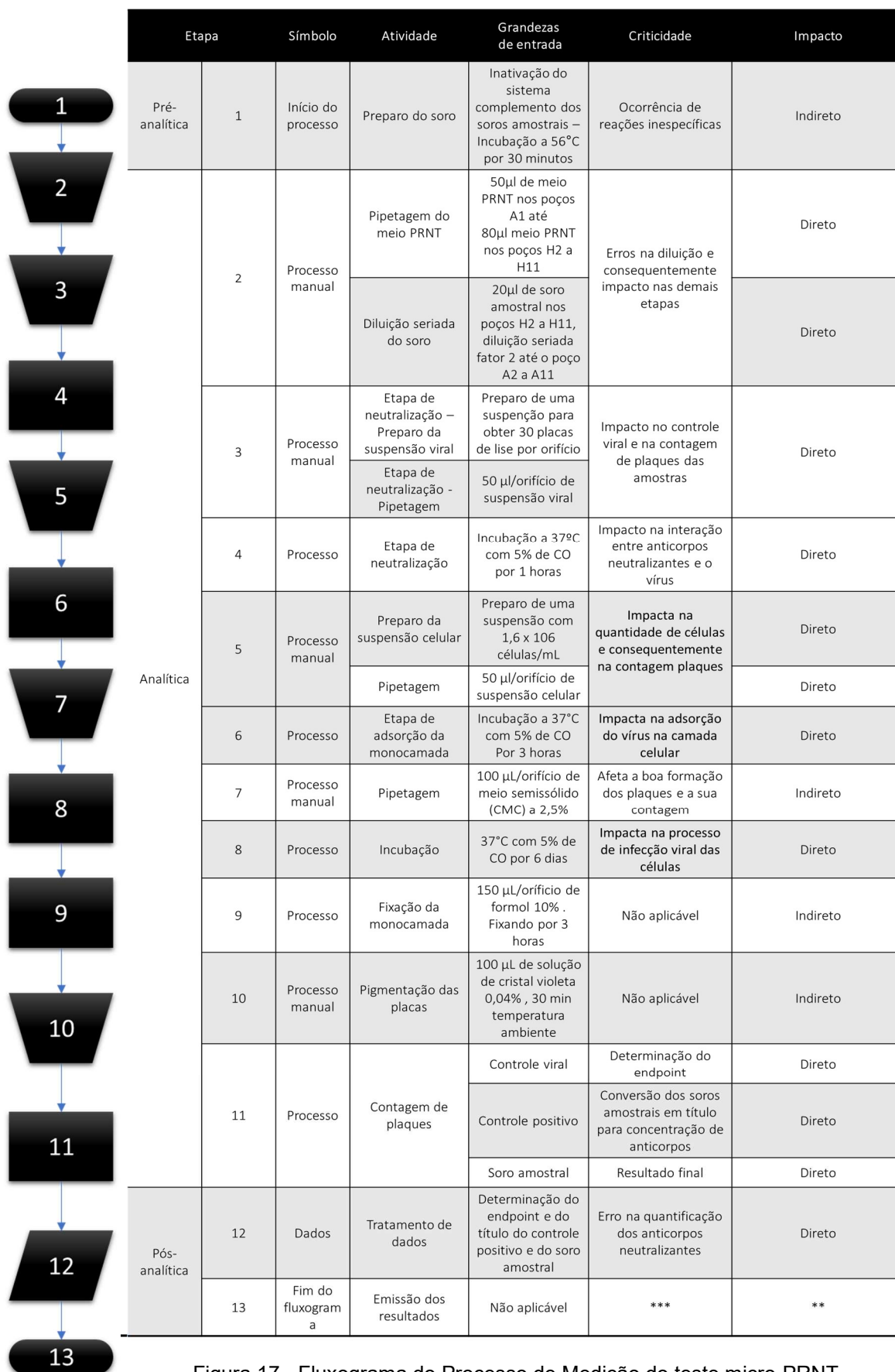


Figura 17 - Fluxograma do Processo de Medição do teste micro-PRNT
Fonte: o autor (2018)

Das trezes etapas existentes na metodologia, nove foram classificadas como impacto direto no resultado de medição do ensaio. São eles:

- Etapa 2 – preparo da placa,
- Etapa 3 – Etapa preparo da suspensão viral,
- Etapa 4 – etapa de neutralização,
- Etapa 5 – preparo da suspensão celular,
- Etapa 6 – etapa de adsorção da monocamada,
- Etapa 7 – pipetagem da CMC
- Etapa 8 – incubação de 6 dias.
- Etapa 11 – contagem de plaques
- Etapa 13 – Tratamento dos dados

As fontes classificadas como impacto direto foram sumarizadas em diagrama de causa-e-efeito da figura 18.

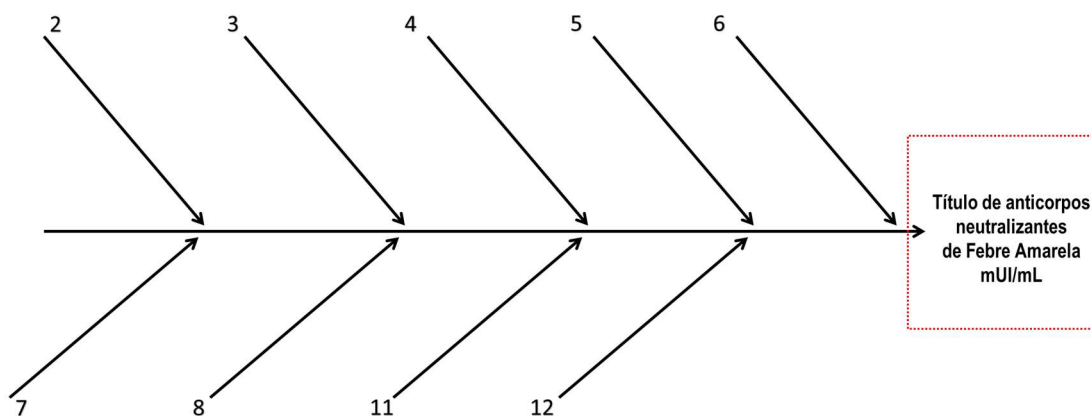


Figura 18 - Diagrama de causa-e-efeito para as etapas críticas

Rastreando as fontes de incertezas do processo de medição identificadas na figura 18 e a sua relação com o modelo matemático (Quadro 5) que determina a concentração de anticorpos neutralizantes, fica evidente que dificilmente haverá um modelo que define a medição que envolva todas as fontes de contribuição. Este tipo de perfil é característico de metodologias analítica e ganha novos contornos quando um bioensaio é avaliado a luz da metrologia, devido a sua complexidade.

Quadro 5 - Rastreabilidade das etapas do micro-PRNT em função do modelo matemático

Variável de saída	Variável de entrada	Componentes	Aspectos do processo
Concentração de anticorpos neutralizantes anti-Febre Amarela em soro mUI/ml $C_{mUI/ml} = T_a \times \frac{C_{SR}}{T_{CP}}$	Valor do Soro (mUI/ml)	- Valor do certificado	-Estabilidade e preparo do soro
	Título do controle positivo (Recíproca da diluição)	- Variabilidade do título - Diluição seriada (volume)	-Variabilidade intra e interplaca
	$T_{SR} = \frac{(EP_{50} - a)}{b}$	- Valor do <i>endpoint</i> 50 - Coeficiente de inclinação - Coeficiente de intercepção	-Preparo da suspensão celular -Preparo da suspensão viral
	Título do soro amostral (Recíproca da diluição)	- Variabilidade do título - Diluição seriada (volume)	-Variabilidade intra e interplaca
	$T_a = \frac{(EP_{50} - a)}{b}$	- Valor do <i>endpoint</i> 50 - Coeficiente de inclinação - Coeficiente de intercepção	-Preparo da suspensão celular -Preparo da suspensão viral

Fonte: o autor (2018)

O micro-PRNT é um ensaio baseado em célula que mede a quantidade de anticorpos neutralizantes anti-FA de maneira indireta através de uma cultura *in vitro* que depende da interação de vírus, células e da presença de anticorpos no soro a ser testado. O ensaio, conforme pode ser visto no fluxograma, é essencialmente manual tendo o operador como uma fonte principal de variação associada a precisão e podendo afetar também a exatidão da metodologia, pois todo o processo de diluição é realizado por pipetagem manual e mesmo que o instrumento esteja calibrado a participação do usuário é determinante para um bom resultado.

Analisando as etapas críticas identificadas e as características da metodologia, concluiu-se que cada um dos componentes identificados como críticos e proporcionam uma gama de variabilidades que serão percebidas em termos de:

- repetitividade dentro de um mesmo ensaio ou na execução do mesmo em dias e por analistas diferentes,
- tendência do resultado em se afastar de um valor de referência,
- a presença de anticorpos de outros flavivírus, como por exemplo, existe evidências que sugerem que, particularmente, a infecção por Dengue

e para o vírus Zika podem parcialmente proteger contra a Febre Amarela (MONATH, 2001).

- pequenas variações que possam ocorrer em alguns durante a rotina de laboratório em processo que afetam o princípio do ensaio de neutralização como suspensão celular e viral e o tempo de adsorção e de neutralização.

Cabe ressaltar que de acordo com a literatura, a variabilidade analítica tem como componentes principais a incerteza associada a precisão e exatidão, que refletem as características de repetitividade e tendência da metodologia e que são desafiadas em estudos de validação. Baseada nas conclusões obtidas após a identificação dos processos críticos e as características da metodologia, um diagrama de causa-e-efeito foi construído relacionando os componentes que afetam o teste micro-PRNT.

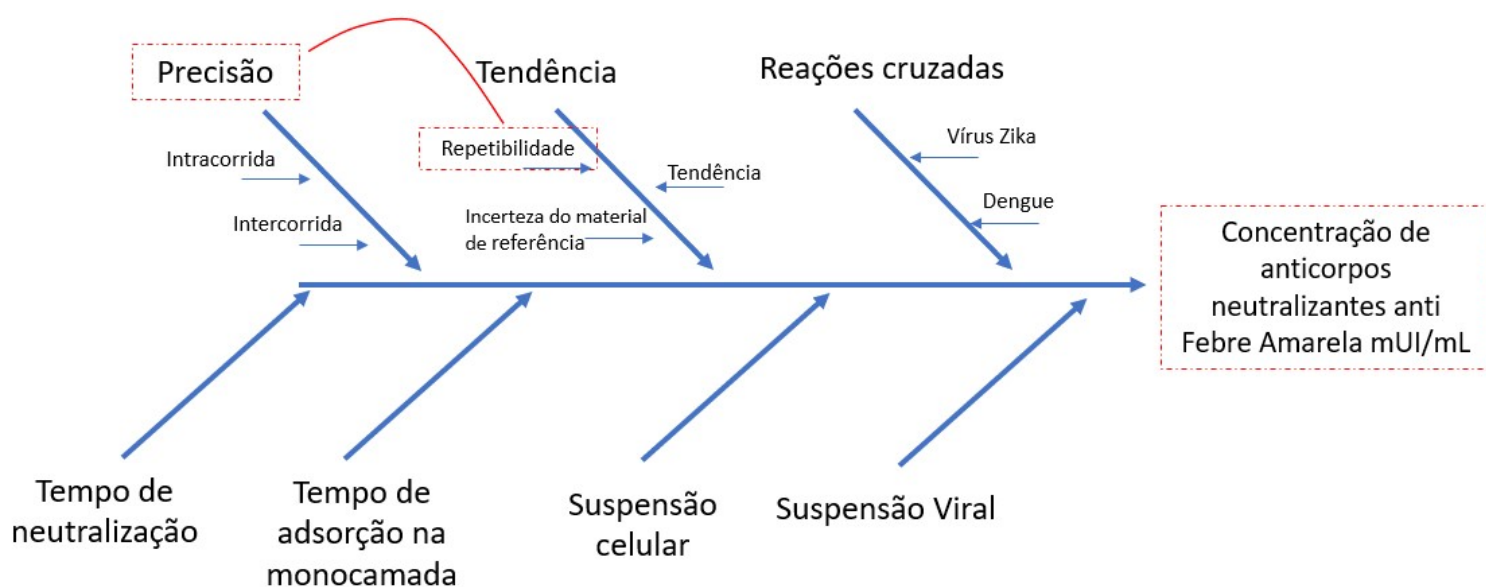


Figura 19 - Diagrama de causa-e-efeito fontes de incerteza da metodologia

Fonte: o autor (2018)

Na figura 19, foi identificado que a repetitividade é um componente que se repete no diagrama de causa-e-efeito. Na literatura científica, a incerteza relacionada a tendência, avaliada no teste de exatidão, é estimada considerando os seguintes componentes: repetitividade, incerteza do material de referência e a tendência, isto é, a diferença entre o valor de referência e o valor obtido. Entretanto, neste trabalho, a incerteza associada a repetitividade na exatidão não foi considerada, pois entende-se

que este componente foi extensivamente testado, avaliado e já foi combinada a incerteza obtida no estudo de precisão.

Nas ocasiões em que uma modelagem não pode ser definida ou quando a mesma é incompleta, os dados obtidos nos estudos de validação são a fonte para avaliar a incerteza global do ensaio. O método foi validado de acordo com RDC 27/2012 onde foram realizados testes precisão, exatidão, seletividade. O laboratório também realizou testes para avaliação da robustez.

Dessa maneira, os parâmetros avaliados na validação representam as principais fontes para determinação da incerteza do ensaio (Figura 20) como também as variáveis referentes ao processo que foram classificados como impacto direto.

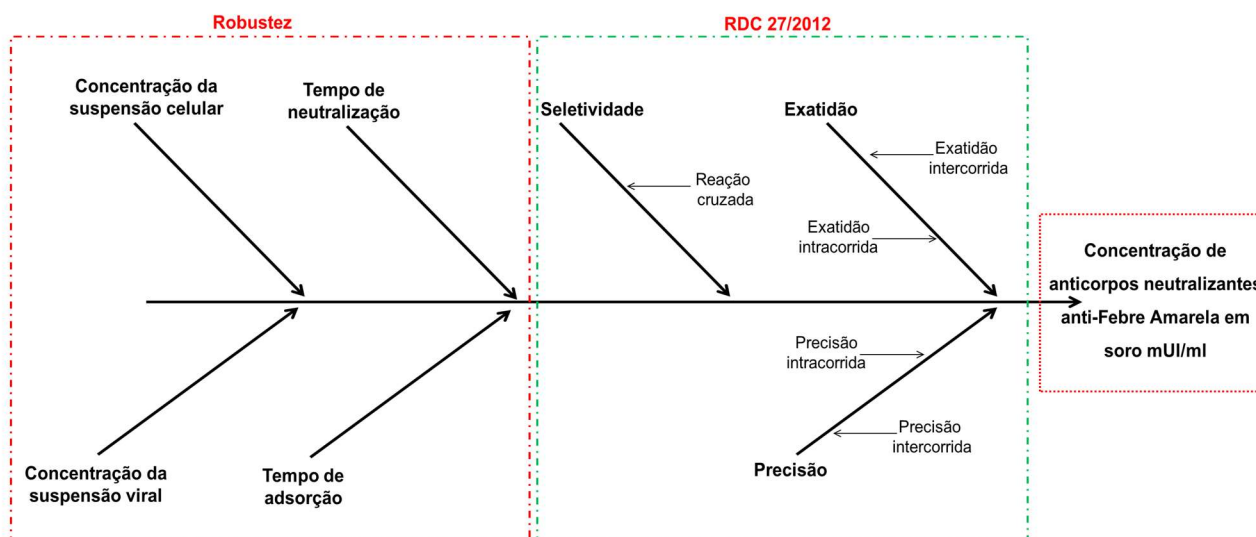


Figura 20 - Diagrama de causa-e-efeito para os dados de validação

6.3 ETAPA 3 - QUANTIFICAÇÃO DAS FONTES DE INCERTEZA

6.3.1 Incerteza obtida no teste de precisão (precisão intracorrída e precisão intercorrída)

O estudo de precisão, conduzido na validação do método, avaliou a repetitividade soros denominados alto, médio e baixo, sendo 16 soros ao total, em três dias distintos para avaliar a precisão intracorrída e intercorrída. Para verificar o comportamento da incerteza para diferentes níveis de anticorpo, foram calculadas a incerteza de cada amostra classificada com alta, média e baixa. As medidas de

concentração tendem a variar de acordo com a quantidade do analito. Entretanto, com base nos resultados apresentados na tabela 2, pode-se constatar que a variação de precisão não está relacionada com o nível de anticorpo presente em cada amostra. Percebe-se que a diferentes valores incertezas (u_p) para cada amostra, o que pode indicar que a incerteza associada a precisão está relacionada a condução do ensaio propriamente dito do que a presença de uma alta ou baixa quantidade de anticorpos.

Pode ser observado através da contribuição de cada incerteza é a precisão intracorrída (u_{p1}) foi maior que a intercorrída (u_{p2}), sendo principal fator de contribuição de incerteza em 15 soros testados. A incerteza do teste de precisão (u_p) para cada soro considerou a maior variação intracorrída dos ensaios realizados nos três dias e dos 16 soros testados em três dias diferentes,

Para o cálculo da incerteza combinada, foi escolhida a maior incerteza intracorrída (soro SIH17, soro alto) que foi combinada com a pior incerteza associada a precisão intercorrída (soro SIH271, soro alto).

Tabela 2 - Incerteza Teste de Precisão – \log_{10} mUI/mL

Nível de anticorpo	Identificação da amostra	Estudo de precisão			Contribuição				
		u_{p1}	u_{p2}	u_p	$C1u_x^2$	$C1u_x^2$	$Ciux^2$ (%)	$Ciux^2$ (%)	total
alto	202	0,122	0,047	0,235	0,0150	0,0022	87	13	100
	228	0,057	0,038	0,170	0,0033	0,0014	70	30	100
	17	0,192	0,075	0,373	0,0368	0,0057	87	13	100
	271	0,065	0,080	0,346	0,0043	0,0064	40	60	100
médio	250	0,078	0,038	0,178	0,0060	0,0014	81	19	100
	8	0,122	0,049	0,243	0,0150	0,0025	86	14	100
	269	0,086	0,038	0,288	0,0074	0,0014	84	16	100
	71	0,082	0,040	0,189	0,0067	0,0016	81	19	100
	172	0,086	0,057	0,255	0,0074	0,0032	70	30	100
	68	0,122	0,061	0,287	0,0150	0,0038	80	20	100
baixo	256	0,110	0,049	0,237	0,0122	0,0025	83	17	100
	129	0,045	0,024	0,110	0,0020	0,0006	78	22	100
	232	0,151	0,054	0,275	0,0228	0,0029	89	11	100
	139	0,073	0,038	0,176	0,0054	0,0014	79	21	100
	144	0,106	0,042	0,209	0,0113	0,0018	86	14	100
	268	0,069	0,035	0,165	0,0048	0,0013	79	21	100

6.3.2 Incerteza obtida no teste de exatidão

O teste de exatidão foi realizado analisando o soro *in-house* que é um padrão com alto nível de anticorpo neutralizante não diluído e mais cinco diluições (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) comparando o resultado obtido com o valor nominal do soro para calcular o ERP. De acordo com a referida legislação a exatidão deve ser analisado intracorrída e o mesmo procedimento dever ser repetido em pelo menos três dias.

Para determinar a incerteza da exatidão em mUI/mL, foi utilizado os resultados dos três dias (n=15) onde foram calculados a média, o desvio padrão da amostra e o ERP. O componente u_{e1} é o erro relativo, que representa a diferença entre o valor nominal e o observado. Ressalta-se que na metrologia, a diferença entre o valor nominal e a média dos valores observados é chamado de tendência. Com base nos resultados, percebe-se que o ensaio tende a apresentar valores maiores do que esperado.

Toda medição é na verdade uma estimativa de um suposto valor verdadeiro, o que aumenta a importância de adicionar a incerteza relativa a tendência a incerteza final do método, pois os resultados não são corrigidos em rotina. Através do estudo de validação seguido da avaliação da incerteza foi possível verificar que o pior foi encontrado no ponto 1:32 que foi -0,044 \log_{10} mUI/mL (tabela 3) e que está dentro da especificação da validação, este valor atribuído como a incerteza associada a tendência da metodologia.

Tabela 3 - Incerteza exatidão \log_{10} mU/mL

Pontos	Valor esperado		Valor observado	Desvio padrão	EPR
					u_{e1}
	mUI/ml	\log_{10} mUI/mL			
Não diluído	10264	4,011	4,011	0,113	0
1:2	5132	3,71	3,711	0,134	-0,00022
1:4	2566	3,409	3,462	0,127	-0,001
1:8	1283	3,108	3,11	0,121	-0,053
1:16	641,5	2,807	2,851	0,218	-0,002
1:32	320,75	2,506	2,588	0,142	-0,044

6.3.2.1 A avaliação da incerteza da calibração do soro *in-house* (u_{e2})

A calibração do soro *in-house*, foi realizada com a finalidade de determinar um valor de concentração de anticorpos neutralizantes anti-FA em mUI/mL a partir da conversão do resultado do seu título em recíproca da diluição utilizando um soro de referência internacional. Desta maneira, o valor que foi determinado, recebeu diretamente a incerteza das outras grandezas medidas no modelo matemático. Modelo este, que pôde ser derivado para avaliação da contribuição dos seus componentes, isto é, das grandezas de entrada em relação a grandeza de saída.

$$C_{mUI/ml} = \left(T_a \times \frac{C_{SR}}{T_{CP}} \right) \quad (14)$$

Para identificar a fontes de incerteza referente a calibração do soro *in-house*, foram elaborados dois diagramas de causa e efeito. O primeiro, relacionando as variáveis de entrada (T_{CP} - título do controle positivo, T_a - título do soro amostral e concentração do soro de referência C_{SR}) com a variável de saída (concentração de anticorpos anti-FA), tendo por base a equação X. Com base nos componentes identificados na figura 21, foi estruturado um novo diagrama agrupando aqueles que se repetiam com a finalidade de evitar uma incerteza superestimada (figura 22).

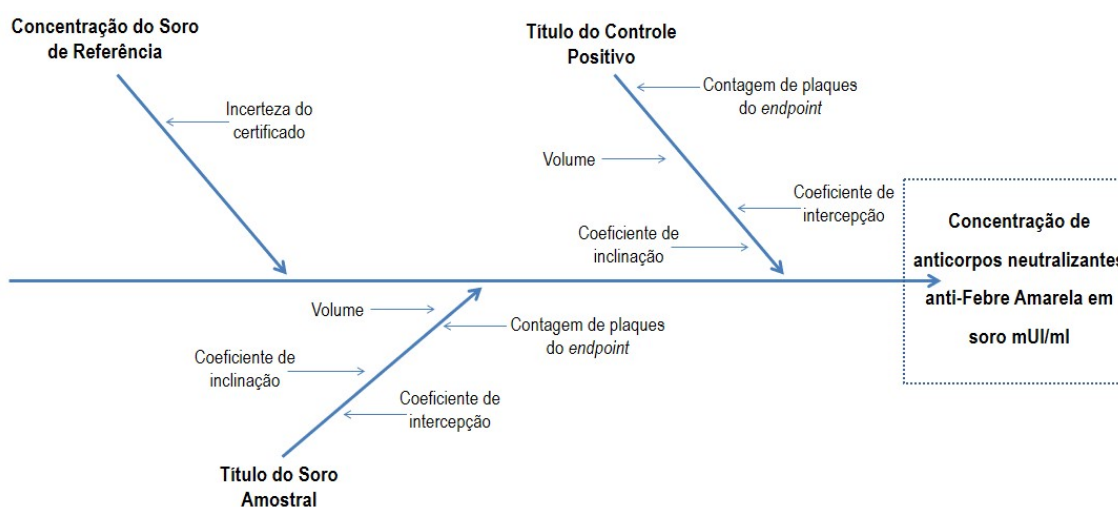


Figura 21 - Diagrama de causa e efeito para determinação da concentração de anticorpos neutralizantes em mUI/mL

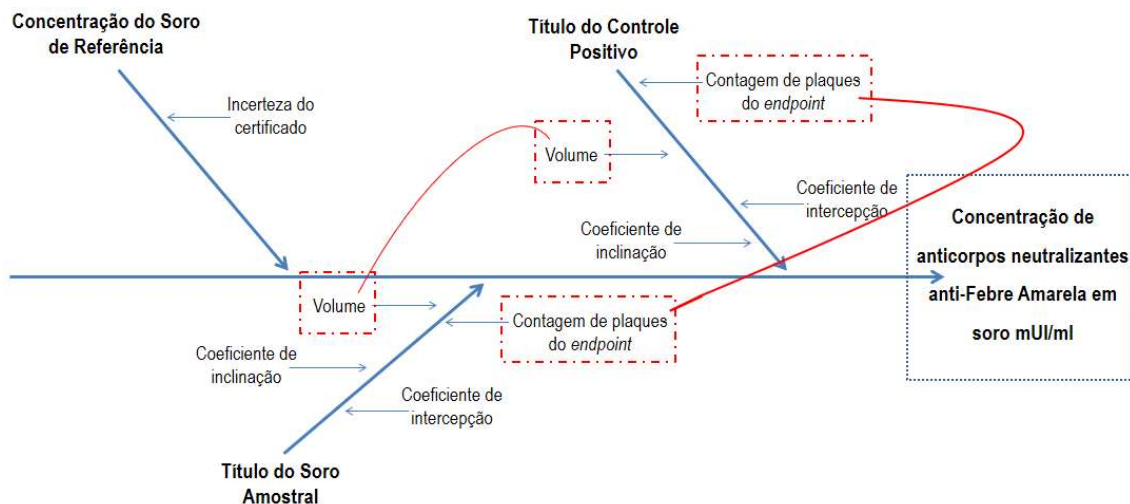


Figura 22 - Diagrama de causa e efeito para determinação da concentração de anticorpos neutralizantes em mUI/mL – eliminando fontes de variação duplicadas

Os componentes que foram considerados para determinar a incerteza da calibração do soro *in-house* em mUI/mL foram as três principais entradas, presentes no cálculo da concentração foram as seguintes:

- Título do soro amostral: Estimado a partir das variações das 10 replicatas realizadas em cada ensaio. Sendo uma incerteza do tipo A.
- Título do controle positivo: Estimado a partir das variações das 3 replicatas realizadas em cada ensaio. Sendo uma incerteza do tipo A.
- Concentração do soro de referência: Estimado a partir de uma série de variações supostas. Sendo uma incerteza do tipo B.

Além disso, foi identificado a existência de duas fontes de erros que influenciam o valor do mensurando na calibração como:

- Incerteza obtida a partir da variação das contagens de plaques de lise do controle viral de cada ensaio. Sendo uma incerteza do tipo A.
- Incerteza do volume associado ao processo de diluição seriada dos soros de cada ensaio. Sendo uma incerteza do tipo B.

Vale ressaltar que no processo de identificação, foi definido que as incertezas relacionadas ao coeficiente de inclinação e interceptação de cada medição já estariam agregadas na variabilidade presente nas replicatas dos títulos em recíproca da diluição. Sendo assim, a avaliar a incerteza desses coeficientes para cada replicata para depois, agregar em uma incerteza combinada não seria útil e superestimaria a incerteza da concentração do soro *in-house*.

Com base nos diagramas causa-e-efeito das figuras 21 e 22, foi estabelecido o modelo que define a medição considerando os erros oriundos da contagem de plaques de pipetagem das placas. Este modelo foi derivado para determinar a contribuição dos componentes existentes na equação original. Com relação aos “erros”, o valor quantificado foi atribuído diretamente a estimativa da incerteza do resultado para cada dia de ensaio.

$$C_{mUI/ml} = \left(T_a \times \frac{C_{SR}}{T_{CP}} \right) + \varepsilon_{vc} + \varepsilon_V \quad (15)$$

$$u_{c\,di\,ax}^2(y) = \left(\frac{\partial C_{mUI/ml}}{\partial T_a} \right)^2 u^2 + \left(\frac{\partial C_{mUI/ml}}{\partial C_{SR}} \right)^2 u^2 + \left(\frac{\partial C_{mUI/ml}}{\partial T_{CP}} \right)^2 u^2 + \varepsilon_{vc}^2 + \varepsilon_V^2 \quad (16)$$

Em uma análise realizada previamente, foi constatado que Como os resultados dos títulos em recíproca da diluição apresentaram normalidade foram estimados a média e o desvio padrão e, por conseguinte, a incerteza tipo A (Tabela 4). No caso do controle de vírus, a contagem de elementos discretos, caracteriza-se uma distribuição de Poisson. Sendo assim, o estimador de dispersão será a raiz da média conforme e o seu divisor é 1.

Tabela 4 - Incerteza tipo A

Ensaio	CP (1:X)			Soro <i>In-house</i> (1:X)			Controle Viral (PFU)		
	\bar{x}	σ	u_A	\bar{x}	σ	u_A	\bar{x}	\sqrt{m}	u_A
Dia 1	279,7	±12,89	±7,441839	202,5	±49,9 9	±15,806603	23,3	4,827	4,827
Dia 2	265,8	±57,27	±33,06325	227,8	±74,1 9	±23,459363	12,9	3,5917	3,5917
Dia 3	263,6	±2,84	±1,639835	176,2	±28,7 4	±9,0872089	25,2	5,02	5,02

A etapa de preparo da placa foi realizada utilizando uma pipeta multicanal (20 a 200) µL calibrada nos pontos 20 µL, 100 µL e 200 µL. Como o erro não foi corrigido, o mesmo entra como componente de contribuição na variabilidade onde, para estimar a incerteza associado a ausência de correção por parte do usuário.

Para se estimar a incerteza do volume foram escolhidos o maior erro e a maior incerteza, que representam o pior caso da multicanal. O maior erro no ponto 20 µL foi de -0,50 µL do canal 2 e a maior incerteza ±0,24 µL (k=2,17) do canal 11. Para estimar

a incerteza do volume 50 μL e 80 μL foram escolhidos o maior erro e incerteza do ponto 100 μL que foi de -0,70 μL no canal 7 e maior incerteza $\pm 0,43 \mu\text{L}$ ($k=2,25$)

A incerteza do certificado foi dividida pelo valor de k , para normalizar a incerteza colocando-a em nível de probabilidade de 68% para combinada com a incerteza relativa. Com base nessas informações, foram obtidas as incertezas associadas ao volume 20 μL , 50 μL e 80 μL conforme as equações 17, 18 e 19:

$$u_{v20} = \sqrt{\left(\frac{0,01105\mu\text{L}}{20\mu\text{L}}\right)^2 + \left(\frac{-0,50\mu\text{L}}{20\mu\text{L}}\right)^2} = \pm 0,500612 \quad (17)$$

$$u_{v50} = \sqrt{\left(\frac{0,025\mu\text{L}}{50\mu\text{L}}\right)^2 + \left(\frac{-0,782\mu\text{L}}{50\mu\text{L}}\right)^2} = \pm 0,720785 \quad (18)$$

$$u_{v8} = \sqrt{\left(\frac{0,19815\mu\text{L}}{80\mu\text{L}}\right)^2 + \left(\frac{-0,72\mu\text{L}}{80\mu\text{L}}\right)^2} = \pm 0,720491 \quad (19)$$

As incertezas associadas aos volumes, foram combinadas obtendo a resultado obtido foi de $\pm 1,34491$.

No teste micro-PRNT, o material de referência para anticorpos anti-FA é o soro de referência anti-Febre Amarela que foi estabelecido em 1965 pelo *Expert Committee on Biological Standardization* da OMS que designou a atividade contida em 0,5 mg do preparo de referência internacional como a Unidade Internacional do soro anti-Febre Amarela (KRAG *et al.*, 1965).

Os valores dos materiais de referência biológicos são apresentados sem a expressão do valor de sua incerteza, sob o argumento de que “resumir todos os componentes da variabilidade observados em um estudo colaborativo citando um único valor de incerteza pode não ser útil” (WHO, 2006).

O GUM (INMETRO, 2012) permite que a incerteza seja obtida de maneira empírica, este tipo de incerteza é do tipo B. Como o certificado não apresenta uma incerteza associada ao título de anticorpos neutralizantes em mUI/mL e sabendo que o soro de referência é um soro produzido por um instituto de referência cujo preparo foi padronizado 1965 e desde então tem sido amplamente utilizado, foi atribuída uma variação de 10% em relação ao valor de referência de 143 UI/mL declarado na instrução de uso. Entretanto, outras possíveis variações foram investigadas por atribuir variações supostas ao valor de certificado.

Tabela 5 - Incerteza atribuída ao valor do soro de referência

Valor de Referência	14400 mUI/mL				
Variação % assumida	2,5	5	10	20	30
Valor da incerteza	±360 mUI/mL	±720 mUI/mL	±1440 mUI/mL	±2880 mUI/mL	±4320 mUI/mL
Distribuição atribuída	Retangular				
Incerteza normalizada	±103,92 mUI/mL	±207,85 mUI/mL	±415,69 mUI/mL	±831,38 mUI/mL	±1247,08 mUI/mL

Foram calculadas as incertezas para as cinco variações atribuídas conforme a tabela 5 para o soro de referência. Para cada dia de ensaio, com base no modelo abaixo, os coeficientes de sensibilidade para cada uma das três entradas principais do modelo matemático. As incertezas obtidas pelo volume e pela variação da contagem de plaques do controle viral foram multiplicadas por 1, pois não fazem parte da equação de conversão dos resultados de título em recíproca da diluição para mUI/mL.

Após combinação e quantificação das fontes de incerteza, as mesmas foram, foram expandidas a 90% multiplicando cada uma das incertezas apresentadas no apêndice A quadro por 1,68. Dessa forma o resultado do soro *in-house* calibrado e a incerteza, considerando a variação de 10% foi de (10220±3809,90) mUI/mL.

Para transformar esta incerteza em \log_{10} foi necessário utilizar a seguinte expressão, baseada na teoria de erros de Taylor:

$$\Delta \log_b x = \frac{U}{x \cdot \ln b} \quad (20)$$

Onde U é incerteza expandida do mensurando, x é o valor do mensurando, e b é a base da função logarítmica. Sendo assim o resultado do mensurando e a incerteza em é de (4,00 ±0,16) \log_{10} mUI/mL.

Tabela 6 - Incerteza soro *in-house*

Variação (%)		2,5			5			10			20			30		
Incerteza atribuída ao soro de referência ± a		360			720			1440			2880			4320		
Fontes de Incerteza		dia 1	dia 2	dia 3	dia 1	dia 2	dia 3	dia 1	dia 2	dia 3	dia 1	dia 2	dia 3	dia 1	dia 2	dia 3
Contribuição (Ci*u)^2 [%]	Soro in-house	93,8705	98,0705	91,9198	79,2985	92,7159	74,0254	48,9209	76,0966	41,6178	19,3187	44,3195	15,1273	9,6184	26,1320	7,3403
	Soro Referência	6,1254	1,9250	8,0577	20,6982	7,2799	25,9565	51,0769	23,9190	58,3720	80,6804	55,6785	84,8689	90,3811	73,8667	92,6579
	Título CP	0,0004	0,0027	0,0001	0,0004	0,0026	0,0001	0,0002	0,0021	0,0001	0,0001	0,0012	0,0001	0,0001	0,0001	0,0010
	controle viral	0,0035	0,0222	0,0222	0,0029	0,0015	0,0178	0,0018	0,0012	0,0100	0,0001	0,0007	0,0037	0,0003	0,0003	0,0018
Incerteza combinada (mUI/mL) ±		1784,47			1891			2267,8			3380,53			4679,04		
Incerteza Expandida (mUI/mL) ±		3568,94			3782			4535,6			6761,06			9358,08		
Incerteza relativa (%)		35			37			44			66			91		
Incerteza expandida (log 10 mUI/mL) ±		0,15			0,16			0,19			0,29			0,40		

Analisando as incertezas obtidas atribuindo diferentes variações ao valor convencionado (tabela 6), percebe-se que o aumento na variação da incerteza atribuída do soro de referência internacional aumenta sua contribuição percentual na incerteza, em mUI/mL, relacionada ao soro in-house calibrado. A contribuição da incerteza do soro de referência chega a 90% caso o valor de referência tenha uma variação de 30%. Ainda que, as medições biológicas sejam complexas, se faz necessário a implementação de infraestrutura metrológica e busca pelo fornecimento das informações referentes as variações relacionadas aos valores de referência. Essas informações proporcionariam melhoria para comparabilidade dos resultados de medições, pois a variação do soro de referência tem impacto direto no valor do resultado do micro-PRNT e conseqüentemente, na calibração do soro *in-house*.

A contribuição da incerteza do soro *in-house* para a incerteza relacionada ao teste de exatidão (tabela 6), chega a 100%. Entretanto, pode ser visto que a incerteza associada as replicatas foi mais representativa na diluição 1:4. Vale ressaltar que a variação assumida para o Soro de Referência, devido à ausência de informação, foi de 10%. Caso a variação seja maior, impactará significativamente os resultados. Para o cálculo da incerteza combinada foi considerado a incerteza $\pm 0,096 \log_{10}$ mUI/mL referente a diluição 1:32 que apresentou a maior incerteza.

Tabela 7 - Incerteza combinada do Teste de Exatidão

pontos	componentes		uE	contribuição			
	ue1	ue2		C1ux ²	C1ux ²	Ciux ² (%)	Ciux ² (%)
Não diluído	0	0,097	0,029	0	0,0094	0	100
1:2	-0,001	0,097	0,035	0,0000	0,0094	0	100
1:4	-0,053	0,097	0,064	0,0028	0,0094	23	77
1:8	-0,002	0,097	0,031	0,0000	0,0094	0	100
1:16	-0,044	0,097	0,073	0,0019	0,0094	17	83
1:32	-0,082	0,097	0,096	0,0067	0,0094	42	58

6.3.3 Incerteza associada ao teste de robustez

Dos três soros avaliados, todos apresentaram variação menor que 0,477 (tabela 8). É declarado que um paciente soro-converteu quando há um aumento de quatro vezes em nível de anticorpos, o que matematicamente em log significa um aumento de 0,6020 (NEUTA, 2009). As variações abaixo do limite não foram consideradas como fonte de incerteza.

Tabela 8 - Teste de robustez

SORO AMOSTRAL	Título Condição PADRÃO log ₁₀ mUI/ml	Título Condição DESVIO 1 log ₁₀ mUI/ml	Título Condição DESVIO 2 log ₁₀ mUI/ml	DIFERENÇA ABSOLUTA DESVIO 1	DIFERENÇA ABSOLUTA DESVIO 2
Tempo de adsorção					
SIH 014	3,96	4,01	3,98	-0,05	-0,02
SIH 145	3,53	3,5	3,41	0,03	0,12
SIH 146	3,76	3,75	3,47	0,01	0,29
Tempo de neutralização					
SIH 014	3,76	3,98	3,88	-0,22	-0,12
SIH 145	3,39	3,43	3,49	-0,05	-0,1
SIH 146	3,44	3,45	3,86	-0,02	-0,42
Diluição viral					
SIH 014	3,91	3,84	4,06	0,07	-0,15
SIH 145	3,48	3,41	3,5	0,08	-0,01
SIH 146	3,7	3,51	3,59	0,19	0,11
Suspensão celular					
SIH 014	3,87	3,9	4,08	-0,03	-0,21
SIH 145	3,34	3,16	3,67	0,18	-0,33
SIH 146	3,56	3,46	4,03	0,1	-0,47

6.3.4 Incerteza associada ao teste de seletividade.

O critério de aceitação do teste de seletividade: a diferença entre a concentração do soro positivo pra Febre Amarela não diluído quando diluído em um soro positivo para Dengue ou Zika vírus não poderia ser maior que três vezes, o que matematicamente na escala logarítmica de base 10 equivale a um aumento de 0,477.

Analisando os dados obtidos durante o estudo de especificidade, todos os soros testados ficaram dentro do critério. Para os 5 soros positivos para Febre Amarela e diluídos em soro positivo para Zika vírus a maior diferença foi de -0,13 em log₁₀ mUI/mL

Para os 5 soros positivos para Febre Amarela e diluídos em três diferentes soros positivos para Dengue a maior diferença foi de -0,46 em \log_{10} mUI/mL e os demais ficaram abaixo de 0,31, isto é, com uma diferença igual ou menor que duas vezes ao soro não diluído.

De acordo com literatura científica, quando um soro se converte há um aumento de quatro vezes em nível de anticorpos, o que matematicamente em log significa um aumento de 0,6020 (NEUTA, 2009).

Todos os soros positivos para os flavivírus Dengue e Zika e negativos para o vírus da Febre Amarela obtiveram resultado negativos.

Essas diferenças não serão consideradas como contribuição de incerteza, pois o teste mostrou especificidade. Adiciona-se que, qualquer interferência devido à presença de anticorpos neutralizantes é não desejada para este tipo de ensaio e caso houvesse, o teste não atenderia o uso pretendido não estando apto para ser utilizado em estudos de imunogenicidade.

6.4 ETAPA – 4 DETERMINAÇÃO DA INCERTEZA COMBINADA E EXPANDIDA

Dos dados analisados do estudo de validação, foram considerados como fontes de incerteza os resultados obtidos no teste de precisão e exatidão, uma vez que o ensaio se mostrou seletivo para os Flavivírus Dengue e Zika e se mostrou robusto para alterações referentes a concentração da suspensão celular, na titulação viral, tempo de neutralização e tempo de adsorção.

Dessa forma, foram combinadas as incertezas obtidas no estudo de precisão e exatidão.

$$u_c = \sqrt{0,280^2 + 0,0157^2} \quad (21)$$

$$u_c = \pm 0,2088 \log_{10} mUI/mL \quad (22)$$

De acordo com o GUM (INMETRO, 2012), a incerteza combinada pode ser usada para expressar a incerteza de um resultado de medição. Não há uma legislação ou norma com relação a incerteza voltada para ensaio biológico ou ensaios em célula que orientem o uso da incerteza expandida. A incerteza combinada neste trabalho foi obtida de um extenso ensaio de validação onde as maiores variações foram consideradas para a combinação. Ainda que a mesma seja representativa para o uso, neste trabalho, a incerteza do método foi expandida a 95,45% com objetivo de

proporcionar a maior segurança para classificar indivíduos como positivo ou negativo em relação a concentração de anticorpos anti-FA proporcionando mais segurança para estabelecer um delineamento de zona cinza seguido de tomadas de decisões

$$u_c = \pm 0,2088 \log_{10} \frac{mUI}{mL} \times 2,00 \quad (23)$$

$$U_{95,45\%} = \pm 0,42 \log_{10} \frac{mUI}{mL} \quad (24)$$

Além disso, as incertezas para cada soro foram estimadas para avaliar se existe relação entre a incerteza e o nível de anticorpo presente nas amostras (Apêndice F). Evidenciou-se que não existe relação entre o nível de concentração e a incerteza, o que leva a concluir que as variações são oriundas do processo de medição, isto é, depende da metodologia.

6.5 DETERMINANDO A ZONA CINZA DO ENSAIO: AVALIAÇÃO DA INCERTEZA NA LINHA DE CORTE

O guia da Eurachem (2007) define diretrizes para o uso de incerteza para garantia de conformidade de resultados onde são estabelecidas zonas para aceite, reprovação e monitoramento. Entretanto, dentro da realidade de um ensaio biológico os critérios apresentados podem não ser úteis, pois como a variabilidade é alta e a criação de mais de uma zona de incerteza seria mais útil no uso de liberação de produtos ou processo.

Para o ensaio objeto deste estudo, foi utilizado o mesmo procedimento realizado por PERREIRA *et al.* (2015) que teve a finalidade de determinar a zona cinza em um teste de diagnóstico para que o mesmo apresentasse classificação ternária (negativo, indeterminado e positivo). Cabe ressaltar que este foi o primeiro trabalho encontrado na literatura onde a incerteza foi usada com este propósito.

A linha de corte do ensaio micro-PRNT é de 794 mUI/mL. Abaixo desses valores é considerado como um soro negativo e acima positivo. Aplicando a incerteza de medição nos valores citados conforme descrito (PEREIRA *et al.*, 2015), a zona cinza para os resultados em mUI/mL foi determinada através da incerteza do método como a região compreendida entre 303,93 mUI/mL a 2079,52 mUI/mL e na escala logarítmica de 2,48 a 3,32.

Como o ensaio do micro-PRNT é utilizado para diversos estudos, pode existir alguma ocasião que uma incerteza expandida em outros níveis de probabilidade seja necessária. O valor da incerteza combinada do teste micro-PRNT foi expandido em diferentes níveis de probabilidade como pode ser visto na Tabela 9 e 10 para delinear zonas cinzas com diferentes abrangências para resultados em \log_{10} mUI/mL e mUI/mL.

Tabela 9 - Delineamento de zona cinza em \log_{10} mUI/mL para diferentes níveis de probabilidade em

log 10 mUI/mL					
cutoff	Incerteza combinada	Incerteza expandida U 68,27%, k=1,000	Incerteza expandida U 90%, k=1,645	Incerteza expandida U 95%, k=1,96	Incerteza expandida U 95,45%, k=2
2,9	0,21	0,21	0,34	0,41	0,42
Início da zona cinza	2,69	2,69	2,56	2,49	2,48
Fim da zona cinza	3,11	3,11	3,24	3,31	3,32

Tabela 10 - Delineamento de zona cinza em mUI/mL para diferentes níveis de probabilidade em

mUI/ml					
cutoff	Incerteza combinada	Incerteza expandida U 68,27%, k=1,000	Incerteza expandida U 90%, k=1,645	Incerteza expandida U 95%, k=1,96	Incerteza expandida U 95,45%, k=2
795	0,21	0,21	0,34	0,41	0,42
Início da zona cinza	491,55	491,55	359,62	309,83	303,93
Fim da zona cinza	1285,78	1285,78	1757,46	2039,91	2079,52

Com base no delineamento da zona cinza obtido pela incerteza a 95,45%, foi elaborado um algoritmo decisório (figura 23) para auxiliar a reanálise de amostras cujo resultado for considerado “zona cinza”. O objetivo deste trabalho foi propor um algoritmo que pudesse auxiliar o melhor uso da incerteza de medição do teste micro-PRNT. Entendeu-se que as amostras consideradas “zona cinza”, precisam de mais dois ensaios, três ao todo, para concluir se a mesma é positiva ou negativa. Ressalta-se que, o aprofundamento do uso deste algoritmo, precisa ser testada e implementado com objetivo de avaliar se o mesmo é aplicável.

A aplicação da incerteza como ferramenta para avaliação da linha de corte em ensaios de neutralização seguindo as abordagens metroológicas para auxiliar a tomada de decisão de reanálise de amostras, não foi encontrado na literatura. Acredita-se que isso se deve ao tímido desenvolvimento da metrologia neste campo, o que dificulta a comparabilidade deste resultado.

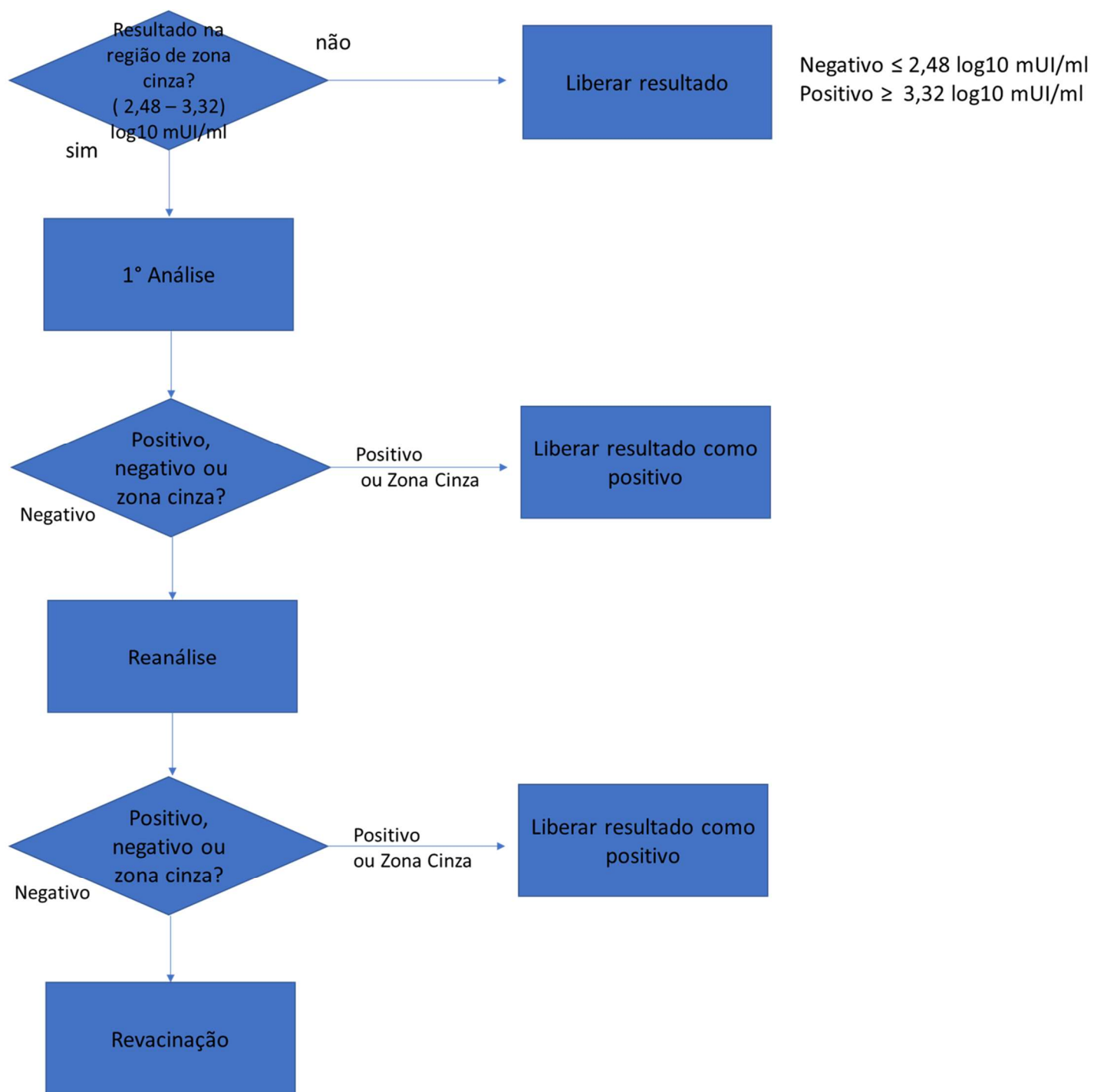


Figura 23 - Algoritmo decisório baseado na zona cinza
Fonte: o autor (2018)

7 CONCLUSÃO

O trabalho relatado nesta dissertação mostra a relevância de avaliar a incerteza de medição em ensaios de neutralização por redução de plaques de lise utilizados em estudos de imunogenicidade com o propósito de determinar a zona cinza do ensaio utilizando dados de validação do ensaio. A zona cinza para os resultados em mUI/mL foi determinada através da incerteza obtida de um extenso estudo de validação onde as maiores incertezas obtidas durante os testes de precisão e exatidão foram consideradas. A incerteza expandida, com um fator de abrangência de 95,45%, do ensaio micro-PRNT foi de $\pm 0,42 \log_{10}$ mUI/mL, foi determinada e, considerando a linha de corte de $2,90 \log_{10}$ mUI/mL, a zona cinza foi delineada entre $2,48 \log_{10}$ mUI/mL a $3,32 \log_{10}$ mUI/mL, equivalente a 303,93 mUI/mL a 2079,52 mUI/mL. Dessa maneira será possível que os resultados sejam classificados como negativo, indeterminado e positivo. Com os resultados positivos, será declarado que a amostra apresenta atividade de anticorpos neutralizantes, o que indica resposta humoral seja por contato com o vírus ou por resposta à vacina 17D. As amostras negativas indicam ausência de anticorpos anti-FA. As amostras indeterminadas são consideradas aquelas cujos resultados não conclusivos e que, de acordo com a condução do estudo clínico, amostras dos pacientes testados poderiam ser coletadas novamente para reanálise para avaliar a resposta humoral. A incerteza do método foi apresentada em diferentes níveis de probabilidade que poderão ser utilizados em diferentes estudos de acordo com a criticidade. Com a avaliação da incerteza, foi observado que a variação do PRNT não está relacionada com a quantidade de anticorpos presentes nos soros denominados alto, médio e baixo. Sendo uma variação existente no processo de obtenção dos seus resultados. A precisão foi o maior componente da incerteza combinada em todos os 16 soros analisados. É importante ressaltar que a avaliação da incerteza fornece informação e confiabilidade ao resultado vinculado ao propósito de uso, entretanto que a maneira com que os resultados serão tratados dependerá única e exclusivamente do pesquisador.

8 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinar o nível de anticorpo utilizando modelos de regressão linear como probit, logit e log-log para interpolar o *endpoint*₅₀ e avaliar se a alteração da curva da regressão impacta na incerteza do micro-PRNT.
- Utilizar o título do controle positivo como forma de avaliar a incerteza do ensaio e sua variabilidade ao longo do tempo.
- Utilizar os resultados obtidos na validação e na avaliação da incerteza para implementar ferramentas de controle de processos ao micro-PRNT conforme as abordagens recentes referentes a metrologia para ensaios baseado em células.
- Como a estimativa de incerteza de um método pode ser determinada através de dados de validação, as discussões aqui presentes podem ser implementadas em outros testes de neutralização como em outros ensaios imunológicos e sorológicos para determinação da zona cinza.
- Implementar o algoritmo decisório para avaliar a sua aplicação e os seus impactos para a rotina.
- Elaborar um manual de incerteza aplicada a ensaios biológicos com ênfase no delineamento da zona cinza em ensaios cujos resultados quantitativos são classificados através de uma linha de corte.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA FIOCRUZ. Ministério da Saúde atualiza casos de febre amarela <<http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42558-ministerio-da-saude-atualiza-casos-de-febre-amarela-6>> Data de acesso: 26/02/2018.

BARWICK V.J.; ELLISON, S.L.R. Valid Analytical Measurement (VAM) Protocol for uncertainty evaluation from validation data (2000). Project 3.2.1 Development and Harmonization of Measurement Uncertainty Principles Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data. LGC Group.

BENNETT, John E.; DOLIN, Raphael; BLASER, Martin J. Flaviviruses In. **Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases**. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015.

BIO-MANGUINHOS/ FIOCRUZ. Fornecimento. (2016) disponível em: http://www.bio.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=60&Itemid=355 Data de acesso: 20 out 2016

BRASIL. ANVISA. Resolução RDC no27, 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. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 22 mai. 2012.

BRASIL. CONMETRO. Resolução no01, de 10 de abril de 2013. Dispõe sobre a aprovação do documento "Diretrizes Estratégicas para a Metrologia Brasileira 2013-2017". Diário Oficial da União. Rio de Janeiro, RJ, 10 abril. 2013

COHEN, J. e cols. Plaque reduction neutralization test for measles antibodies: Description of a standardised laboratory method for use in immunogenicity studies of aerosol vaccination. *Vaccine*, v. 26, n. 1, p. 59-66, 2007.

CO-ORDINATION OF NANOMETROLOGY IN EUROPE – Co-Nanomet. Introductory guide to nanometrology, 2015. Disponível em: https://www.ptb.de/cms/fileadmin/internet/fachabteilungen/abteilung_5/5.1_oberflaechenmesstechnik/introductory_guide_2015_08_27.pdf Data de acesso: 15 out 2016

DE BIÈVRE, P. Metrological traceability is a prerequisite for evaluation of measurement uncertainty. *Accreditation Quality Assurance*, v.15, p.437-438, fev. 2010

COUTO, P.R.G; DAMASCENO, J.C; DE OLIVEIRA, S.P. Monte Carlo simulations applied to Uncertainty in measurement. In: CHAN, V.W.K. Theory and Applications of

Monte Carlo Simulations. S1: InTech, 2013, cap. 2, p. 27-51. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/theory-and-applications-of-monte-carlo-simulations/monte-carlo-simulations-applied-to-uncertainty-in-measurement> Data de acesso: 15 fev 2017

ELLISON , S L R; WILLIAMS, A. EURACHEM/CITAC Guide quantifying uncertainty in analytical measurement Third Edition 2012. Disponível em: http://www.citac.cc/QUAM2012_P1.pdf. Data de acesso: 20 out 2016.

ELLISON , S L R; WILLIAMS, A. Use of uncertainty information in compliance assessment. Primeira edição. Eurachem/CITAC.

ELSTER, C; KLAUENBERG, K; WALZEL, M; WÜBBELER, G; HARRIS, P; COX, M; MATTHEWS, C; SMITH, I; WRIGHT, L; ALLARD, A; FISCHER, N; COWEN , S; ELLISON, S; WILSON, P; PENNECCHI, F; KOK, G; VAN DER VEEN, A; PENDRILL, L; A guide to Bayesian inference for regression problems, European Metrology Research Programme (EMRP) Project NEW04 – Novel mathematical and statistical approaches to uncertainty evaluation, 2015. Disponível em: <https://www.ptb.de/emrp/fileadmin/documents/nmasatue/NEW04/Papers/BPGWP1.pdf> Data de acesso: 23 out 2016

ERRIU,M. Direct measurement of ultrasonic activity on microbial metabolismo and analysis of related uncertainty. 2013. 143 f. Tese. – Politecnico di Torina, Torino, 2013.

FIGUEIREDO, E. R. de. Avaliação da aplicação e normas vigentes de validação de bioensaios para a pesquisa clínica. 2014. 96 f Dissertação (Pós-graduação em Gestão Pesquisa e Desenvolvimento na Industria Farmacêutica) Instituto de tecnologia em fármacos Farmaguinhos, Rio de Janeiro, 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION/ FDA. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>. Acesso em: 22 set.2016.

FRANÇA, International Committee for Weights and Measures – BIPM. Comité Consultatif pour la Quantité de Matière – CCQM, 21° reunião (2015), 2015, 37 p.

GOLDANI, L.Z. Yellow fever outbreak in Brazil, 2017. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2017; vol. 21; n°2; p. 123–124. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/bjid/v21n2/1413-8670-bjid-21-02-0123.pdf> Acesso em 26/02/2018.

INSTITUTO DE PESOS E MEDIDAS DO ESTADO DE SÃO PAULO – IPEM-SP. Conceitos Básicos sobre Medição, 2013. Disponível: http://www.ipem.sp.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=3&Itemid=258 Data de acesso: 20/10/2016

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA – INMETRO. Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais de termos associados - VIM 2012. Duque de Caxias, RJ : INMETRO, 2012, 94 p.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA – INMETRO. Avaliação de dados de medição: guia para expressão da incerteza de medição – GUM 2008. Duque de Caxias, RJ : INMETRO, 2012, 141 p

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA - INMETRO. Exemplos de estimativa de incerteza de medição em ensaios microbiológicos. DOQ-CGCRE-053. 2014. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=5&cod_uo_numeracao=00581&num_documento=053>. Acesso em: 7 set. 2016.

JONKER, E.F.; VISSER, L.G.; ROUKENS, A.H. 2013. Advances and controversies in yellow fever vaccination. *Ther Adv Vaccines* 1:144-152.

LIMA, C.G.R.D. Padronização de teste de potência in vitro para vacinas que contenham toxoide alfa de *Clostridium novyi* tipo B. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.78, n.4, p.507-512, 2011.

LIMA, Couto. D. Risco de reurbanização da febre amarela no Brasil facilitada por população competente de mosquitos do gênero *Aedes*. 2017. 124. Tese – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

MIRANDA, E.H. Padronização e Validação do teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise em placa de 96 poços para avaliar a imunogenicidade da componente caxumba da vacina MMR. 2015. 120 f Dissertação (Pós-graduação em Gestão Pesquisa e Desenvolvimento na Industria Farmacêutica) Instituto de tecnologia em fármacos Farmaguinhos, Rio de Janeiro, 2015.

MONATH, P.M.; WOODALL, J.P.; DUANE, G.J.; YUILL, T.M.; MACKENZIE, J.S.; MARTINS, R.M.; REITER, P. e HEYMANN, D.L. Yellow fever vaccine supply: a possible solution. 2016. Vol. 387; No. 10028, p1599–1600, 16 April 2016.

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

MUKHOPADHYAY S., KUHN R., ROSSMANN M. (2005) A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 3: 13–22

NORONHA, T.G; CAMACHO, L.A.B. Controvérsias sobre a ampliação das áreas com vacinação de rotina contra a febre amarela no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2017; vol. 37; n°10.

OLIVEIRA, G.G.D. *Ensaio Clínicos: princípios e prática*. Brasília: Editora Sobravime, 2006.

OPAS – Organização Pan-americana da Saúde. *Boas Práticas Clínicas: Documento das Américas*, 2005, 102 p.

PEREIRA, P.; MAGNUSSON, B.; THEODROSSON, E.; WESTGARD, J.O.; ENCARNAÇÃO, P. Measurement uncertainty as a tool for evaluating the 'grey zone' to reduce the false neagatives in immunochemical screening of blood donos for infectious diseases. *Accred. Qual Assur* (2016) 21:25-32.

PERREIRA, P. Uncertainty of measurement in medical laboratories. In Cocco, L. *New Trends and Developments in Metrology*. Sl: InTech, 2016, cap. 3, p. 51-80. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/new-trends-and-developments-in-metrology/uncertainty-of-measurement-in-medical-laboratories> Data de acesso: 20 Out 2016

PHYSIKALISCH-TECHNISCHE BUNDESANSTALT – PTB. Working Group 8.41 mathematical modelling and simulation, 2016. Disponível em: <https://www.ptb.de/cms/en/ptb/fachabteilungen/abt8/fb-84/ag-841/flowzytometrie-8410.html> Data de acesso: 22 Out 2016.

POSSAS, C.; MARTINS, R.M.; de OLIVEIRA, R.L e HOMMA, AKIRA. Urgent call for action: avoiding spread and re-urbanisation of yellow fever in Brazil. 2018. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; Vol. 113. n° 1. p. 1-2.

ROERING, J.T; HOMBAC, J; BARRET, A.D. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. *Viral Immunol* 2008; 21(2):123-32.

ROZET, E.; MARINI, R.D.; ZIEMONS, E.; BOULANGER, B.; HUBERT, Ph. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. V. 55; n. 4; p; 848-858, 2011.

SALJE, H.; RODRÍGUEZ-BARRAQUER, I.; RAINWATER-LOVETT, K.; NISALAK, A.; THAISOMBOOSUK, B.; THOMAS, S. J.; FERNANDEZ, S.; JARMAN, R.G.; YOON, I.K.; CUMMINGS, D.A.T. Variability in Dengue titer estimates from plaque reduction neutralization tests poses a challenge to epidemiological studies and vaccine development. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. v. 8, n. 6, 2014

Santos, N.O. S.; Benati J.F. Diag. In: Santos, N.S.O.; *Diagnóstico Laboratorial das Viroses*. In: Santos, N.S.O.; Romanos, M.T.V.; Wigg M.D. *Introdução à Virologia Humana*. 2nd. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S.A. 2008. p. 81-116.

SHAKAR, G. Immune monitoring: it's prudent to adopt current quality regulations. *TRENDS in Biotechnology*. v. 20, n.12, p. 495-497, 2002.

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. 99 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

STEPHENS, P.R.S.; OLIVEIRA, M.B.S.C; RIBEIRO, F.C.; CARNEIRO, L.A.B. Virologia. In MOLINARO, E.M.; CAPUTO, L.G.F.; AMENDOEIRA, M.R.R. *Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde*. SI: EPSJV/IOC, 2009, cap. 4, p. 125-220. Disponível em: <http://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/cap2.pdf> Data de acesso: 4 Feb 2017

TAVERNIERS, I.; VAN BOCKSTAELE, E.; DE LOOSE, M. Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, n.7, 2004

THEODORSSON, E. Uncertainty in Measurement and Total Error: Tools for Coping with Diagnostic Uncertainty. *Clin Lab Med*, v. 37, n.1, pág. 15–34, 2017.

UNITED KINGDOM BIOINDUSTRY ASSOCIATION – BIA. *Better measurement for biotechnology* (2001). Disponível em:

<<http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20060715212709/dti.gov.uk/files/file10468.pdf>>. Data do acesso: 01 Jan 2018.

UNITED STATES PHARMACOPEIA – USP. Biological Assay Validation. 2010. Disponível em: <http://www.ipqpubs.com/wpcontent/uploads/2010/06/USP_1033.pdf>. Data de acesso: 22 dez. 2013.

VIEIRA, V.M.M.; OHAYON, P. Inovação em fármacos e medicamentos: estado-da-arte no Brasil e políticas de P&D. Revista Economia & Gestão da PUC, v. 6, n.13, 2006.

VOIGT, J.; EBERT, B.; HOFFMAN, A.; MACDONALD, R. Validierung eines 'Fluorescent Enzyme Linked Immuno Sandwich Assay' (ELISA). PTB Mitteilungen, v.118, p. 255-260, 2015. Disponível em: https://www.ptb.de/cms/nc/en/ptb/fachabteilungen/abt8/fb-84/ag-842/bayes-elisa.html?tx_bib_pi1%5Bshow_uid%5D=310&cHash=c2463115e7c18ab137142d69dde1112b#c310 Data de acesso: 23 out 2016

WEITZEL, J. Quality by Design for analytical Procedures – Measurement Uncertainty. Journal of Validation Technology. v. 20, n. 3, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Good Manufacturing requirements – Part 2: Validation. 1997. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/1997/WHO_VSQ_97.02.pdf >. Data de acesso: 22 out. 2016.

APENDICE A – VALOR DE K EM FUNÇÃO PARA V GRAUS DE LIBERDADE

Graus de Liberdade v	Nível de Confiança					
	68,27	90	95	95,45	99	99,73
1	1,84	6,31	12,71	13,97	63,66	235,78
2	1,32	2,92	4,3	4,53	9,92	19,21
3	1,2	2,35	3,18	3,31	5,84	9,22
4	1,14	2,13	2,78	2,87	4,6	6,62
5	1,11	2,02	2,57	2,65	4,03	5,51
6	1,09	1,94	2,45	2,52	3,71	4,9
7	1,08	1,89	2,36	2,43	3,5	4,53
8	1,07	1,86	2,31	2,37	3,36	4,28
9	1,06	1,83	2,26	2,32	3,25	4,09
10	1,05	1,81	2,23	2,28	3,17	3,96
11	1,05	1,8	2,2	2,25	3,11	3,85
12	1,04	1,78	2,18	2,23	3,05	3,76
13	1,04	1,77	2,16	2,21	3,01	3,69
14	1,04	1,76	2,14	2,2	2,98	3,64
15	1,03	1,75	2,13	2,18	2,95	3,59
16	1,03	1,75	2,12	2,17	2,92	3,54
17	1,03	1,74	2,11	2,16	2,9	3,51
18	1,03	1,73	2,1	2,15	2,88	3,48
19	1,03	1,73	2,09	2,14	2,86	3,45
20	1,03	1,72	2,09	2,13	2,85	3,42
25	1,02	1,71	2,06	2,11	2,79	3,33
30	1,02	1,7	2,04	2,09	2,75	3,27
35	1,01	1,69	2,03	2,07	2,72	3,23
40	1,01	1,68	2,02	2,06	2,7	3,2
45	1,01	1,68	2,01	2,06	2,69	3,18
50	1,01	1,68	2,01	2,05	2,68	3,16
100	1,005	1,66	1,984	2,025	2,626	3,077
∞	1	1,645	1,96	2	2,576	3

Fonte: Adaptado do guia Avaliação de dados de medição: guia para expressão da incerteza de medição – GUM 2008 (INMETRO, 2012).

APENDICE B – ENSAIO DE CARACTERIZAÇÃO DO SORO *IN-HOUSE* DIA 1

Controle de Vírus		soro in house								
Orifício	Placas de Lise	Replicata	Diluição	Plaques	equação da regressão Y= a + bx		Coeficiente de Pearson	EP50 (Y)	determinar título	mUiml= Ta * (Csr/Tsr) soro de ref 14300
			eixo x	eixo y	alfa	beta		23,3	x=(y-a)/b	
1	39	1	160	25	-5	0,1875	1	151	7717,449074	
2	43		80	10						
3	34	2	320	25	15	0,03125	1	266	13580,52876	
4	46		160	20						
5	51	3	320	27	-1	0,0875	1	278	14199,95047	
6	44		160	13						
7	41	4	160	26	-12	0,2375	1	149	7599,7569	
8	40		80	7						
9	51	5	320	38	2	0,1125	1	189	9680,899016	
10	48		160	20						
11	42	6	320	32	-14	0,14375	1	259	13267,515	
12	49		160	9						
13	49	7	320	35	5	0,09375	1	195	9980,870534	
14	52		160	20						
15	42	8	320	32	8	0,075	1	204	10430,82781	
16	51		160	20						
17	53	9	160	27	-5	0,2	1	142	7235,108507	
18	47		80	11						
19	57	10	320	36	4	0,1	1	193	9868,381215	
20	48		160	20						
21	51						TMG	197,1	média	10077,11
22							desvio padrão	49,98486963		
23							Tipo A	15,80660366		
24							CV	25,3624457		
25		soro de referência								
		Réplica	Diluição	Plaques	equação da regressão Y= a + bx		Coeficiente de Pearson	EP50 (Y)	determinar título	
			eixo x	eixo y	alfa	beta		23,3	x=(y-a)/b	
MÉDIA	46,6	1	320	24	16	0,025	1	292,0		
			160	20						
DP amostra	5,6	2	320	26	4	0,06875	1	280,7		
EP50	23,3		160	15						
ucont	1,2	3	320	28	0	0,0875	1	266,3		
tipo a	1,22		160	14						
							TMG	279,7		
							desvio padrão	12,88964365		
							Tipo A	7,44183923		
							CV	4,608859641		

APENDICE C – ENSAIO DE CARACTERIZAÇÃO DO SORO *IN-HOUSE* DIA 2

Controle de Vírus		soro in house										
Orifício	Placas de Lise	Replicata	Diluição	Plaques	equação da regressão $Y = a + bx$		Coeficiente de Pearson	EP50 (Y)	determinar título	mUiml= Ta * (Csr/Tsr)		
			eixo x	eixo y	alfa	beta		12,9	$x = (y-a)/b$	soro de ref	14300	
1	18	1	320	19	-5	0,075	1	239		12839,77069		
2	22		160	7								
3	26	2	320	17	7	0,03125	1	189		10157,04765		
4	31		160	12								
5	24	3	320	18	0	0,05625	1	229		12337,65675		
6	23		160	9								
7	21	4	320	15	3	0,0375	1	264		14202,65138		
8	24		160	9								
9	27	5	160	18	4	0,0875	1	102		5472,017198		
10	33		80	11								
11	21	6	320	23	-1	0,075	1	185		9970,548191		
12	31		160	11								
13	31	7	640	20	6	0,021875	1	315		16969,40165		
14	20		320	13								
15	36	8	160	14	6	0,05	1	138		7424,113221		
16	31		80	10								
17	25	9	640	22	4	0,028125	1	316		17024,05351		
18	19		320	13								
19		10	320	14	-4	0,05625	1	300		16163,28676		
20			160	5								
21								TMG	215,2	média	11576,3	
22								desvio padrão	74,18502194	desvio padrão		
23								Tipo A	23,45936376	Tipo A		
24								CV	34,47561457	CV		
25		soro de referência										
		Réplica	Diluição	Plaques	equação da regressão $Y = a + bx$		Coeficiente de Pearson	EP50 (Y)	determinar título			
			eixo x	eixo y	alfa	beta		12,9	$x = (y-a)/b$			
MÉDIA	25,7	1	320	13	5	0,025	1	316,0				
DP poisson	5,1		160	9								
DP amostra	5,3	2	320	15	-1	0,05	1	278,0				
EP50	12,9		160	7								
ucont	1,25	3	320	18	4	0,04375	1	203,4				
Tipo A	1,254549		160	11								
							TMG	265,8				
							desvio padrão	57,26724557				
							Tipo A	33,06325964				
							CV	21,54446716				

APENDICE D- ENSAIO DE CARACTERIZAÇÃO DO SORO *IN-HOUSE* DIA 3

Controle de Vírus		soro in house										
Orifício	Placas de Lise	Replicata	Diluição	Plaques	equação da regressão Y= a + bx		Coeficiente de Pearson	EP50 (Y) 25,2	determinar título x=(y-a)/b	mUiml= Ta * (Csr/Tsr)		
			eixo x	eixo y	alfa	beta				soro de ref	14300	
1	44	1	320	44	-4	0,15	1	195		10977,44944		
2	52		160	20								
3	51	2	160	26	-4	0,1875	1	156		8781,959551		
4	55		80	11								
5	47	3	320	35	7	0,0875	1	208		11729,32954		
6	47		160	21								
7	52	4	160	29	7	0,1375	1	132		7464,118797		
8	50		80	18								
9	46	5	320	40	2	0,11875	1	195		11017,02208		
10	44		160	21								
11	56	6	320	28	22	0,01875	1	171		9624,065262		
12	59		160	25								
13	53	7	160	26	12	0,0875	1	151		8506,986258		
14	51		80	19								
15	46	8	160	27	9	0,1125	1	144		8120,305065		
16	44		80	18								
17	45	9	160	29	-9	0,2375	1	144		8120,305065		
18	57		80	10								
19	55	10	320	31	19	0,0375	1	165		9323,313222		
20	54		160	25								
21	51							TMG	164,4	CMG	9268,849	
22								desvio padrão	25,61362881			
23								Tipo A	8,099740619			
24								CV	15,58314659			
25		soro de referência										
		Réplica	Diluição	Plaques	equação da regressão Y= a + bx		Coeficiente de Pearson	EP50 (Y) 25,2	determinar título x=(y-a)/b			
			eixo x	eixo y	alfa	beta						
MÉDIA	50,4	1	320	31	1	0,09375	1	258,1				
			160	16								
DP poisson	7,1	2	320	30	8	0,06875	1	250,2				
DP amostra	4,6		160	19								
EP50	25,2	3	320	29	11	0,05625	1	252,4				
ucont	1,01		160	20								
Tipo A	1,094358							TMG	253,6			
							desvio padrão	4,096940476				
							Tipo A	2,365369687				
							CV	1,615598606				

**APÊNDICE E – RESULTADOS DO TESTE DE PRECISÃO INTRACORRIDA LOG
10 MUI/ML**

Nível de anticorpos	Soro	Resultados	Dia 1 (Operador A)	Dia 2 (Operador A)	Dia 3 (Operador B)
Alto	202	\bar{x}	4,02	3,93	4,10
		σ	0,30	0,11	0,15
		CV	7,50	2,76	3,64
	228	\bar{x}	3,67	3,92	3,90
		σ	0,14	0,07	0,14
		CV	3,79	1,82	3,49
	017	\bar{x}	4,26	4,36	3,95
		σ	0,12	0,14	0,47
		CV	2,76	3,17	11,84
	271	\bar{x}	4,37	4,29	3,68
		σ	0,01	0,16	0,15
		CV	0,33	3,72	4,12
Médio	250	\bar{x}	3,60	3,76	3,61
		σ	0,19	0,09	0,15
		CV	5,21	2,29	4,26
	008	\bar{x}	3,73	3,68	3,57
		σ	0,30	0,10	0,17
		CV	8,02	2,64	4,69
	269	\bar{x}	3,88	3,94	3,75
		σ	0,21	0,13	0,09
		CV	5,34	3,20	2,39
	071	\bar{x}	3,38	3,55	3,33
		σ	0,07	0,20	0,13
		CV	2,10	5,68	3,93
	172	\bar{x}	3,78	4,14	3,80
		σ	0,21	0,21	0,09
		CV	5,54	4,96	2,26
	068	\bar{x}	3,98	4,01	3,65
		σ	0,30	0,13	0,13
		CV	7,58	3,14	3,66
Baixo	256	\bar{x}	3,20	3,11	2,94
		σ	0,27	0,12	0,16
		CV	8,53	3,71	5,43
	129	\bar{x}	3,30	3,31	3,27
		σ	0,09	0,11	0,10
		CV	2,74	3,27	3,05
	232	\bar{x}	3,65	3,68	3,58
		σ	0,37	0,06	0,19
		CV	10,02	1,58	5,25
	139	\bar{x}	3,42	3,50	3,60
		σ	0,18	0,08	0,16
		CV	5,31	2,30	4,32
	144	\bar{x}	3,16	3,25	3,18
		σ	0,07	0,26	0,19
		CV	2,18	7,85	5,92
	268	\bar{x}	3,52	3,69	3,55
		σ	0,10	0,13	0,17
		CV	2,89	3,42	4,84

APÊNDICE F – RESULTADOS DA INCERTEZA POR SORO

log ₁₀ mUI/mL															
Amostras			estudo de precisão			estudo de exatidão			Estimativas						
Nível de anticorpos	Identificação da amostra	Resultado n=18	up1	up2	uP	ue1	ue2	uE	contribuição (%)		Incerteza combinada	Incerteza expandida U 68,27%, k=1,000	Incerteza expandida U 90%, k=1,645	Incerteza expandida U 95%, k=1,96	Incerteza expandida U 95,45%, k=2
alto	202	4,02	0,1225	0,047	0,13	-0,082	0,095	0,01	91	9	0,13	0,13	0,22	0,26	0,26
	228	3,83	0,0572	0,038	0,07	-0,082	0,095	0,02	81	19	0,07	0,07	0,12	0,14	0,14
	17	4,20	0,1919	0,075	0,21	-0,082	0,095	0,02	93	7	0,20677	0,21	0,34	0,41	0,41
	271	4,12	0,0653	0,080	0,10	-0,082	0,095	0,02	87	13	0,10	0,10	0,17	0,20	0,21
médio	250	3,66	0,0776	0,038	0,09	-0,082	0,095	0,02	85	15	0,09	0,09	0,14	0,17	0,18
	8	3,67	0,1225	0,049	0,13	-0,082	0,095	0,02	89	11	0,13	0,13	0,22	0,26	0,27
	269	3,86	0,0857	0,038	0,07	-0,082	0,095	0,02	81	19	0,07	0,07	0,12	0,14	0,14
	71	3,42	0,0816	0,040	0,09	-0,082	0,095	0,02	85	15	0,09	0,09	0,15	0,18	0,18
	172	3,91	0,0857	0,057	0,10	-0,082	0,095	0,02	87	13	0,10	0,10	0,17	0,20	0,21
	68	3,88	0,1225	0,061	0,14	-0,082	0,095	0,02	90	10	0,14	0,14	0,23	0,27	0,28
baixo	256	3,09	0,1102	0,049	0,12	-0,082	0,095	0,02	88	12	0,12	0,12	0,20	0,24	0,24
	129	3,29	0,0449	0,024	0,05	-0,082	0,095	0,02	76	24	0,05	0,05	0,09	0,10	0,11
	232	3,64	0,1511	0,054	0,16	-0,082	0,095	0,02	91	9	0,16	0,16	0,27	0,32	0,32
	139	3,51	0,0735	0,038	0,08	-0,082	0,095	0,02	84	16	0,08	0,08	0,14	0,16	0,17
	144	3,20	0,1061	0,042	0,11	-0,082	0,095	0,02	88	12	0,12	0,12	0,19	0,23	0,23
	268	3,59	0,0694	0,035	0,08	-0,082	0,095	0,02	83	17	0,08	0,08	0,13	0,16	0,16

**ANEXO A – DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE FEBRE AMARELA NOTIFICADOS:
1º/7/2017 A 16/02/2018**

UF (LPI)*	Notificados	Descartados	Em Investigação	Confirmados	Óbitos
AC	1	1	0	-	-
AP	2	2	0	-	-
AM	5	2	3	-	-
PA	24	20	4	-	-
RO	8	6	2	-	-
RR	2	2	0	-	-
TO	12	7	5	-	-
AL	2	1	1	-	-
BA	22	18	4	-	-
CE	2	2	0	-	-
MA	1	1	0	-	-
PE	1	1	0	-	-
PI	3	3	0	-	-
RN	1	1	0	-	-
SE	1	0	1	-	-
DF	33	20	12	1	1
GO	31	20	11	-	-
MT	1	0	1	-	-
MS	5	4	1	-	-
ES	64	51	13	-	-
MG	617	200	192	225	76
RJ	66	5	4	57	24
SP	663	284	198	181	53
PR	31	21	10	-	-
RS	15	6	9	-	-
SC	13	6	7	-	-
Total	1.626	684	478	464	154

Dados preliminares e sujeitos à revisão

*LPI – Local Provável de Infecção