

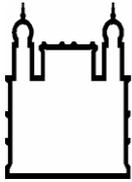
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**  
**MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

**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**

**MARISOL SIMÕES**

**RIO DE JANEIRO**  
**2011**

**MPTI**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**  
**Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

**MARISOL SIMÕES**

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

Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos.

**Rio de Janeiro**  
**2011**

**MPTI**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca de  
Ciências Biomédicas/ ICICT/ FIOCRUZ - RJ

S589

Simões, Marisol.

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. / Marisol Simões. – Rio de Janeiro, 2011.

xvii, 99 f. : il. ; 30 cm.

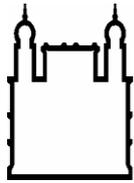
Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Pós-graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2011.

Bibliografia: f. 71-76

1. Febre Amarela. 2. Anticorpos Neutralizantes. 3. PRNT. 4. Confiabilidade. 5. Acurácia. I. Título.

CDD 616.918 54

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, na Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico, Laboratório de Tecnologia Viroológica - LATEV, sob a orientação do Prof. Dr. Marcos da Silva Freire e do Prof. Dr. Luiz Antônio Bastos Camacho.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**  
**Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

**MARISOL SIMÕES**

**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**

**Orientadores:** Prof. Dr. Marcos da Silva Freire

Prof. Dr. Luiz Antônio Bastos Camacho

Dissertação aprovada em 19 de abril de 2011

**Examinadores:**

Dra Maria Beatriz Junqueira Borges  
Bio-Manguinhos/ Fiocruz  
Presidente

Dra Rita Maria Ribeiro Nogueira  
IOC/ Fiocruz

Dr Davis Fernandes Ferreira  
IMPPG/ UFRJ

**Rio de Janeiro**  
**2011**

À minha família – mama Vânia, meus irmãos Wallace, William, Sissi e meu sobrinho Eduardo – e ao meu noivo Bruno dedico esta dissertação, minhas fontes de energia.

Às minhas parceiras de PRNT Emily e Carol dedico esta dissertação, que compartilharam intensamente desta jornada comigo.

## AGRADECIMENTOS

À Fiocruz, Bio-Manguinhos e Fiotec, pelo financiamento e todo suporte técnico-científico.

A todos aqueles que fazem esse mestrado acontecer: Drº Akira Homma, diretor de Bio-Manguinhos Artur Roberto Couto, coordenadora do mestrado Drª Sheila Farage e as secretárias Zaíra Antunes e Andrea Ayrosa (uma nova amiga). Obrigada pela oportunidade de realizar esta dissertação.

Aos meus orientadores, Marcos Freire e Luiz Camacho, não somente por terem aceitado me orientar, como também pela confiança, paciência, dedicação e aprendizado.

À Anna Maya Yoshida, gerente do Latev, por todo carinho, compreensão, aprendizado e disponibilidade. Além, é claro, das agradáveis caronas para Niterói!

À Emily Hime e à Ana Carolina Cajaraville, minhas parceiras-amigas-confidentes, que participaram intensamente deste estudo, não só “com as mãos”, mas também foram a extensão dos meus raciocínios e idéias. E, muitas vezes, foram só ouvidos e ombros para as minhas preocupações e aflições.

À toda equipe maravilhosa do Latev, que direta ou indiretamente participaram deste estudo e me proporcionaram um ambiente de trabalho muito agradável. Em especial: Alice Gomes, Lecila Andrade, Kelly Araújo, Renata Alvim e Renan Vieira (pelo preparo das minhas células e insumos sempre com muito carinho e disponibilidade), Edney Do Monte, Max Areas e Gerson da Silva (pelo fornecimento imprescindível de materiais e equipamentos para a realização deste trabalho), Vanessa Santos e Suellen Alves (que me substituíram na minha ausência para que eu pudesse escrever), Luiz Gustavo Almeida (pela amizade, com direito a caronas muito eficientes de moto e por carregar a minha pasta pesada todos os dias!) e Sheila de Lima (por todo carinho e apoio).

À Beatriz Borges, por ter aceitado ser a minha revisora e contribuir preciosamente para a realização desta dissertação.

Ao Drº Reinaldo Martins por permitir a utilização dos soros humanos do estudo dose-reposta e ao Carlos Frota pela disponibilidade e extrema paciência na separação de amostras de soro.

À Darcy Akemi Hokama e Lilia Ribeiro Serôdio pela receptividade, confiança e apoio.

À turma do MPTI pela companhia nos momentos bons e ruins. Em especial: Talytta Rocha, Renata Fajardo e Francis Carazzai, meus novos amigos.

À Michelle Clarina, companheira e confidente de todas as horas no MPTI.

E aqueles que são eternos, são a minha base, a razão da minha determinação: mama Vânia, meus irmãos Wallace, William e Sissi e meu sobrinho lindo Duduzinho. Obrigada, simplesmente, por me amarem tanto! É esse amor que me fortalece todos os dias.

Ao meu noivo, Bruno, meu equilíbrio. Obrigada pela paciência, carinho, compreensão e amor. Obrigada pela “consultoria” de português e de informática.

E a Deus. Por me proporcionar uma vida com saúde, proteção e determinação para enfrentar os momentos difíceis com humildade, respeito e sabedoria.

“Não há problema que não possa ser solucionado pela paciência”

*Chico Xavier*

# ÍNDICE

<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b> -----	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> -----	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE QUADROS</b> -----	<b>xiv</b>
<b>RESUMO</b> -----	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT</b> -----	<b>xvii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> -----	<b>1</b>
<b>1.1 – A Febre Amarela</b> -----	<b>1</b>
<i>1.1.1 – Apresentação</i> -----	1
<i>1.1.2 – Breve história da doença</i> -----	1
<i>1.1.3 – O agente etiológico</i> -----	4
<i>1.1.4 – Hospedeiros naturais, vetores e ciclos de transmissão</i> -----	8
<i>1.1.5 – Distribuição geográfica e dados epidemiológicos</i> -----	10
<i>1.1.6 – Prevenção e controle da doença</i> -----	12
<i>1.1.7 – Resposta imune humoral do hospedeiro à doença</i> -----	13
<i>1.1.8 – Testes sorológicos para febre amarela</i> -----	14
<i>1.1.8.1 – Testes de neutralização</i> -----	17
<b>1.2 – Conceitos Básicos na Avaliação do Desempenho de um Teste Diagnóstico</b> -----	<b>20</b>
<b>1.3 – Justificativa</b> -----	<b>23</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> -----	<b>25</b>
<b>2.1 – Geral</b> -----	<b>25</b>
<b>2.2 – Específicos</b> -----	<b>25</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> -----	<b>26</b>
<b>3.1 – Soros Amostrais</b> -----	<b>26</b>
<b>3.2 – Soro Padrão <i>In House</i></b> -----	<b>26</b>
<b>3.3 – Vírus</b> -----	<b>26</b>
<b>3.4 – Soluções e Reagentes</b> -----	<b>26</b>
<b>3.5 – Células</b> -----	<b>28</b>
<b>3.6 – <i>Micro</i> PRNT (placa de 96 poços)</b> -----	<b>29</b>
<b>3.7 – PRNT (placa de 6 poços)</b> -----	<b>31</b>
<b>3.8 – Cálculos do Título de Anticorpos</b> -----	<b>33</b>
<b>3.9 – Titulação Viral</b> -----	<b>34</b>

<b>3.10 – Análises Estatísticas</b> -----	<b>35</b>
3.10.1 – Cálculo do tamanho da amostra -----	35
3.10.2 – Seleção dos soros-----	35
3.10.3 – Operadoras-----	35
3.10.4 – Médias e Medidas de Dispersão -----	36
3.10.5 – Análises de confiabilidade -----	36
3.10.6 – Análises de acurácia -----	38
<b>4. RESULTADOS</b> -----	<b>39</b>
<b>4.1 – Análises de Confiabilidade do <i>Micro</i> PRNT<sub>50</sub></b> -----	<b>39</b>
4.1.1 – Repetibilidade -----	39
4.1.2 – Reprodutibilidade-----	43
<b>4.2 – Análises de Acurácia do <i>Micro</i> PRNT<sub>50</sub></b> -----	<b>45</b>
4.2.1 – Determinação do ponto de corte para o PRNT <sub>50</sub> -----	45
4.2.2 – Análise dos parâmetros de acurácia do micro PRNT <sub>50</sub> -----	47
4.2.3 – Curva ROC-----	51
4.2.4 – Prevalência e valores preditivos-----	52
<b>4.3 – Comparação dos Parâmetros de Acurácia Entre o <i>Micro</i> PRNT<sub>50</sub> e o <i>Micro</i> PRNT<sub>90</sub></b> -----	<b>52</b>
4.3.1 – Determinação do ponto de corte para o PRNT <sub>90</sub> -----	52
4.3.2 – Análise dos parâmetros de acurácia do micro PRNT <sub>90</sub> -----	53
4.3.3 – Análises de confiabilidade do micro PRNT <sub>90</sub> -----	56
4.3.4 – Comparação das medidas de acurácia do micro PRNT <sub>50</sub> com o micro PRNT <sub>90</sub> -----	62
<b>5. DISCUSSÃO</b> -----	<b>63</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> -----	<b>70</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> -----	<b>71</b>
<b>8. ANEXOS</b> -----	<b>77</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A – Acurácia

ADCC – Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo (do inglês *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AP – Amapá

ATCC – *American Type Culture Collection*

BA – Bahia

BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio (do inglês *Biochemical Oxygen Demand*)

BR – Brasil

CCI – Coeficiente de Correlação Intraclasse

CEF – Fibroblastos de embrião de galinha (do inglês *Chick Embryo Fibroblasts*)

CMC – Carboximetilcelulose

CV – Coeficiente de variação

DP – Desvio-padrão

E – Especificidade

ELISA – Ensaio imunoenzimático (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EP50 – *End-point* com percentual de redução da infecciosidade viral total de 50%

EP90 – *End-point* com percentual de redução da infecciosidade viral total de 90%

FA – Febre Amarela

FAS – Febre Amarela Silvestre

FAU – Febre Amarela Urbana

FC – Fixação do Complemento

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC<sub>95%</sub> - Intervalo de Confiança de 95%

IFI – Imunofluorescência Indireta

IH – Inibição da Hemaglutinação

IPEC – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

K – Kappa

KDa – Kilodalton

LATEV – Laboratório de Tecnologia Viroológica

MAC-ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with capture of IgM antibodies* (ensaio imunoenzimático com captura de anticorpo IgM)

MS – Ministério da Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

ORF – Fase de Leitura Aberta (do inglês *Open Reading Frame*)

P – Prevalência

$P_e$  – Concordância Esperada

PE – Pernambuco

PNI – Programa Nacional de Imunizações

$P_o$  – Concordância Observada

PRNT – Teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise (do inglês *Plaque Reduction Neutralization Test*)

PRNT<sub>50</sub> – Teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise baseado no EP50

PRNT<sub>90</sub> – Teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise baseado no EP90

q.s.p. – Quantidade Suficiente Para

RJ – Rio de Janeiro

RNA – Ácido ribonucléico (do inglês *Ribonucleic Acid*)

RNT – Regiões Não-Traduzidas

ROC – *Receiver-Operating Characteristic*

S – Sensibilidade

SE – Semana Epidemiológica

SEVAN – Seção de Validação Analítica

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

TN – Teste de Neutralização

UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

WHO/ OMS – World Health Organization/ Organização Mundial da Saúde

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b> Tradução e processamento da poliproteína dos <i>Flavivirus</i> .-----	<b>5</b>
<b>Figura 1.2:</b> Reconstrução de imagem de criomicroscopia eletrônica de uma forma imatura do vírus da FA 17D. -----	<b>6</b>
<b>Figura 1.3:</b> Esquema das etapas do ciclo de replicação dos <i>Flavivirus</i> . -----	<b>7</b>
<b>Figura 1.4:</b> Ciclos de transmissão do vírus da FA na América do Sul e na África. -----	<b>9</b>
<b>Figura 1.5:</b> Áreas de risco de transmissão da FA no mundo. -----	<b>10</b>
<b>Figura 1.6:</b> Distribuição da FA no Brasil. -----	<b>12</b>
<b>Figura 3.1:</b> Esquema ilustrativo da placa de 96 poços para a realização do <i>micro</i> PRNT. -----	<b>29</b>
<b>Figura 3.2:</b> Foto de uma microplaca submetida ao <i>micro</i> PRNT.-----	<b>30</b>
<b>Figura 3.3:</b> Esquema ilustrativo da placa de 24 poços para a realização do PRNT. ---	<b>31</b>
<b>Figura 3.4:</b> Esquema ilustrativo das placas de 6 poços. -----	<b>32</b>
<b>Figura 3.5:</b> Foto de uma placa de 6 poços resultante do PRNT. -----	<b>33</b>
<b>Figura 4.1:</b> Gráfico de dispersão representativo das análises de repetibilidade da dupla A (EP50).-----	<b>40</b>
<b>Figura 4.2:</b> Gráfico de dispersão representativo das análises de repetibilidade da dupla B (EP50).-----	<b>41</b>
<b>Figura 4.3:</b> Gráfico de dispersão representativo das análises de repetibilidade da dupla C (EP50).-----	<b>42</b>
<b>Figura 4.4:</b> Gráfico de dispersão representativo das análises de reprodutibilidade das duplas operadoras (EP50).-----	<b>44</b>
<b>Figura 4.5:</b> Histograma correspondente aos resultados dos 200 soros submetidos ao PRNT (EP50).-----	<b>45</b>
<b>Figura 4.6:</b> Boxplot dos 200 soros amostrais comparando a sua classificação com os seus resultados em placas de 6 poços. -----	<b>46</b>
<b>Figura 4.7:</b> Histograma correspondente às médias dos resultados dos 200 soros submetidos ao <i>micro</i> PRNT (EP50).-----	<b>47</b>
<b>Figura 4.8:</b> Curva ROC com diferentes pontos de corte para o <i>micro</i> PRNT <sub>50</sub> . -----	<b>51</b>

<b>Figura 4.9:</b> Histograma correspondente aos resultados dos 200 soros submetidos ao PRNT (EP90).-----	<b>53</b>
<b>Figura 4.10:</b> Histograma correspondente às médias dos resultados dos 200 soros submetidos ao <i>micro</i> PRNT (EP90).-----	<b>54</b>
<b>Figura 4.11:</b> Gráfico de dispersão representativo das análises de repetibilidade da dupla A (EP90).-----	<b>57</b>
<b>Figura 4.12:</b> Gráfico de dispersão representativo das análises de repetibilidade da dupla B (EP90).-----	<b>58</b>
<b>Figura 4.13:</b> Gráfico de dispersão representativo das análises de repetibilidade da dupla C (EP90).-----	<b>59</b>
<b>Figura 4.14:</b> Gráfico de dispersão representativo das análises de reprodutibilidade das duplas operadoras (EP90).-----	<b>61</b>

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.1:</b> Resumo da história da FA no Brasil. -----	<b>3</b>
<b>Quadro 1.2:</b> Medida de concordância Kappa. -----	<b>21</b>
<b>Quadro 1.3:</b> Possíveis interpretações para o resultado de um teste diagnóstico. -----	<b>22</b>
<b>Quadro 3.1:</b> Títulos de anticorpos contra FA segundo análises independentes pelo <i>micro</i> PRNT.-----	<b>37</b>
<b>Quadro 4.1:</b> Análise de repetibilidade das duplas operadoras (EP50).-----	<b>39</b>
<b>Quadro 4.2:</b> Coeficientes de correlação de Pearson da dupla A (EP50). -----	<b>40</b>
<b>Quadro 4.3:</b> Coeficientes de correlação de Pearson da dupla B (EP50). -----	<b>41</b>
<b>Quadro 4.4:</b> Coeficientes de correlação de Pearson da dupla C (EP50). -----	<b>42</b>
<b>Quadro 4.5:</b> Coeficiente de Correlação Intraclasse da análise de reprodutibilidade do <i>micro</i> PRNT (EP50). -----	<b>43</b>
<b>Quadro 4.6:</b> Coeficientes de correlação de Pearson da análise de correlação do <i>micro</i> PRNT (EP50). -----	<b>44</b>
<b>Quadro 4.7:</b> Parâmetros de acurácia do <i>micro</i> PRNT com ponto de corte de 2,5 Log <sub>10</sub> mUI/mL (EP50). -----	<b>48</b>
<b>Quadro 4.8:</b> Parâmetros de acurácia do <i>micro</i> PRNT com ponto de corte de 2,6 Log <sub>10</sub> mUI/mL (EP50). -----	<b>49</b>
<b>Quadro 4.9:</b> Parâmetros de acurácia do <i>micro</i> PRNT com ponto de corte de 2,7 Log <sub>10</sub> mUI/mL (EP50). -----	<b>49</b>
<b>Quadro 4.10:</b> Parâmetros de acurácia do <i>micro</i> PRNT com ponto de corte de 2,8 Log <sub>10</sub> mUI/mL (EP50). -----	<b>50</b>
<b>Quadro 4.11:</b> Parâmetros de acurácia do <i>micro</i> PRNT com ponto de corte de 2,9 Log <sub>10</sub> mUI/mL (EP50). -----	<b>50</b>
<b>Quadro 4.12:</b> Parâmetros de acurácia do <i>micro</i> PRNT <sub>90</sub> com diferentes pontos de corte. -----	<b>55</b>
<b>Quadro 4.13:</b> Análise de repetibilidade das duplas operadoras (EP90). -----	<b>56</b>
<b>Quadro 4.14:</b> Coeficientes de correlação de Pearson da dupla A (EP90). -----	<b>57</b>
<b>Quadro 4.15:</b> Coeficientes de correlação de Pearson da dupla B (EP90). -----	<b>58</b>

<b>Quadro 4.16:</b> Coeficientes de correlação de Pearson da dupla C (EP90). -----	<b>59</b>
<b>Quadro 4.17:</b> Coeficiente de Correlação Intraclasse da análise de reprodutibilidade do micro PRNT (EP90). -----	<b>60</b>
<b>Quadro 4.18:</b> Coeficientes de correlação de Pearson da análise de correlação do <i>micro</i> PRNT (EP90). -----	<b>61</b>
<b>Quadro 4.19:</b> Comparação dos parâmetros de acurácia do <i>micro</i> PRNT <sub>50</sub> versus o <i>micro</i> PRNT <sub>90</sub> . -----	<b>62</b>

## RESUMO

A febre amarela é causada pelo vírus protótipo do gênero *Flavivirus* e é transmitida ao homem através da picada de mosquitos hematófagos infectados com o agente viral. A doença permanece endêmica em regiões das florestas tropicais da África e América do Sul, apesar da disponibilidade de vacinas eficazes contra o vírus da FA – 17D-204 e 17DD – consideradas seguras e altamente imunogênicas, capazes de induzir uma rápida resposta imune específica, com a formação de anticorpos neutralizantes que aparecem precocemente, são protetores e de longa duração. O teste de neutralização por redução de placas de lise (PRNT) é considerado o teste mais sensível e mais específico para a detecção e quantificação dos anticorpos neutralizantes, sendo o método de referência para a avaliação da resposta imune protetora após a vacinação. Este estudo avaliou a confiabilidade e a acurácia do *micro* PRNT<sub>50</sub> (aplicado em placas de 96 poços) tomando como referência o PRNT<sub>50</sub> (aplicado em placas de 6 poços) e comparou o desempenho do *micro* PRNT<sub>50</sub> com o *micro* PRNT<sub>90</sub> (redução de 50% e 90% das placas de lise, respectivamente). Foram selecionados 200 soros de indivíduos brasileiros que participaram de um estudo clínico de dose-resposta da vacina 17DD produzida em Bio-Manguinhos. A repetibilidade foi aferida a partir de três repetições independentes do teste para cada um dos 200 soros por uma dupla operadora e o mesmo procedimento foi realizado pelas outras duas duplas operadoras, com a finalidade de determinar a reprodutibilidade do *micro* PRNT<sub>50</sub>. Foram determinados o Coeficiente de Correlação Intraclasse (CCI) e o Coeficiente de Correlação de Pearson. As medidas de acurácia determinadas neste estudo foram sensibilidade, especificidade, acurácia global, prevalência e valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN). A curva ROC também foi utilizada para determinar o melhor ponto de corte do *micro* PRNT<sub>50</sub>. Na avaliação da repetibilidade, os CCIs das duplas operadoras variaram entre 0,62 e 0,76; e os coeficientes de correlação de Pearson apresentaram-se entre 0,62 e 0,78. Para a reprodutibilidade, o CCI obtido foi de 0,72 e os coeficientes de correlação de Pearson variaram entre 0,70 e 0,76. As melhores medidas de acurácia foram alcançadas considerando o ponto de corte para o *micro* PRNT<sub>50</sub> de 2,9 Log<sub>10</sub> mUI/mL, o qual apresentou sensibilidade de 91,1%, especificidade de 72,9% e acurácia global de 78%. O melhor desempenho do *micro* PRNT<sub>50</sub> com este ponto de corte foi ratificado pela análise da curva ROC. Considerando um cenário hipotético de surto de FA, a prevalência seria de 28%, com VPP de 56,7% e VPN de 95,5%. O *micro* PRNT<sub>50</sub> apresentou níveis satisfatórios de confiabilidade e de acurácia, mas o *micro* PRNT<sub>90</sub> mostrou desempenho superior com sensibilidade de 100%, especificidade de 94,7% e acurácia global de 95%. Modificações na metodologia do teste e alterações nos critérios de classificação nas leituras dos resultados obtidos serão importantes para melhorar a acurácia do *micro* PRNT.

Palavras-chave: febre amarela; anticorpos neutralizantes; PRNT; confiabilidade; acurácia.

## ABSTRACT

Yellow fever is caused by the prototype virus of the genus *Flavivirus* and it is transmitted to humans through the bite of bloodsucking mosquitoes infected with the viral agent. The disease remains endemic in tropical forest regions from Africa and South America, despite the availability of effective vaccines against yellow fever virus - 17D-204 and 17DD - considered safe and highly immunogenic, capable of inducing a rapid specific immune response, with the formation of neutralizing antibodies that appear early, are protective and long lasting. The plaque reduction neutralization test (PRNT) is considered the most sensitive and most specific test for detection and quantification of neutralizing antibodies, and the reference method for assessing the protective immune response after vaccination. This study evaluated the reliability and accuracy of *micro* PRNT<sub>50</sub> (applied in 96-well plates) with reference to the PRNT<sub>50</sub> (applied in 6-well plates) and compared the performance of the *micro* PRNT<sub>50</sub> with the *micro* PRNT<sub>90</sub>. Two-hundred serum samples from Brazilian individuals who participated in a clinical study of dose-response of 17DD vaccine produced in Bio-Manguinhos were selected. The repeatability was measured from three independent repetitions of the test for each of the 200 sera by a dual operator and the same procedure was performed by the other two dual operators, in order to determine the reproducibility of the *micro* PRNT<sub>50</sub>. The intraclass correlation coefficient (ICC) and Pearson correlation coefficient were determined. Accuracy measures determined in this study were sensitivity, specificity, overall accuracy, prevalence and positive predictive values (PPV) and negative (NPV). The ROC curve was also used to determine the best cut-off point of *micro* PRNT<sub>50</sub>. In the assessment of repeatability, ICCs for dual operators ranged from 0.62 to 0.76, and Pearson correlation coefficients were between 0.62 and 0.78. For reproducibility, the ICC obtained was 0.72 and the Pearson correlation coefficients ranged between 0.70 and 0.76. The best measures of accuracy were achieved considering the cut-off point for the *micro* PRNT<sub>50</sub> of 2.9 log<sub>10</sub> mIU/mL, which had a sensitivity of 91.1%, specificity of 72.9% and overall accuracy of 78%. The best performance of *micro* PRNT<sub>50</sub> with this cut-off point was ratified by the ROC curve analysis. Considering a hypothetical scenario of an outbreak of YF, the prevalence would be 28%, with PPV of 56.7% and NPV of 95.5%. The *micro* PRNT<sub>50</sub> showed satisfactory levels of reliability and accuracy, however the *micro* PRNT<sub>90</sub> showed higher performance with sensitivity of 100%, specificity of 94.7% and overall accuracy of 95%. Modifications in the test methodology and changes in the classification criteria in the readings of the results obtained will be important to improve the accuracy of *micro* PRNT.

Key-words: yellow fever; neutralizing antibodies; PRNT; reliability; accuracy.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 – A Febre Amarela

### 1.1.1 – Apresentação

A febre amarela (FA) é uma doença viral infecciosa não contagiosa, transmitida ao homem através da picada de mosquitos hematófagos da família *Culicidae*, principalmente dos gêneros *Aedes* e *Haemagogus*. O espectro clínico da doença pode variar desde uma apresentação subclínica à grave doença sistêmica apresentando-se, em sua forma clássica, como febre hemorrágica de elevada letalidade (Monath, 2001).

A FA já representou uma das doenças letais mais temidas antes do desenvolvimento de uma vacina eficaz, porém, permanece como um grande problema de saúde pública para milhares de pessoas – em grande parte nas florestas tropicais da África e América do Sul, onde a doença é endêmica, e para milhões de pessoas que viajam para essas áreas. Periodicamente, ocorrem surtos isolados ou epidemias da doença nas áreas endêmicas, as quais podem ter maior ou menor impacto na saúde pública (Tomori, 2004).

### 1.1.2 – Breve história da doença

A primeira descrição da FA é encontrada em um manuscrito Maia, de 1648. Mas, pela análise da sequência genômica, parece que o agente etiológico viral evoluiu de outro vírus transmitido por mosquito há 3000 anos, provavelmente na África, de onde foi importado para o Novo Mundo durante o tráfico negreiro (Zanotto *et al.*, 1996; Monath, 2001).

Durante os séculos XVIII e XIX, epidemias devastadoras assolaram os continentes das Américas e da África e também, de certa forma, da Europa, consagrando a FA como um grande, senão o maior, flagelo nas colônias Americanas e da África Ocidental. O pânico e o caos se deveram à extravagância das especulações sobre a causa da doença. Além disso, a confusão foi agravada pela dificuldade em distingui-la de outras pragas tropicais (malária e dengue) (Schoub & Blackburn, 1995).

Em contrapartida ao que se acreditava até então – de que a contaminação da doença se dava pelo ar – em 1848, Josiah Clark Nott propôs que a FA poderia ser transmitida pela picada de um mosquito; sugestão apoiada pelo médico francês Louis Daniel Beauperthuy alguns anos depois (1854) e, em 1881, pelo médico cubano Carlos Finlay. Finlay apontou o mosquito *Stegomyia fasciata* – hoje conhecido como *Aedes aegypti* – como o transmissor da doença. Em 1900, a Comissão de Febre Amarela do Exército dos Estados Unidos, sob o comando do médico militar Walter Reed, demonstrou através de experimentos históricos em voluntários humanos que a infecção era de fato transmitida de uma pessoa a outra pelo *Aedes*

*aegypti*. A partir dessa descoberta, inúmeras campanhas foram realizadas contra o mosquito nos lugares onde a FA era considerada um problema de saúde pública. Assim, cidades como Havana (Cuba), Rio de Janeiro (Brasil) e outros centros urbanos localizados no Equador, Peru, Colômbia, México e países da América Central adotaram medidas de controle contra o mosquito, levando temporariamente ao desaparecimento da doença em várias zonas tropicais americanas (Chiong, 1989; Benchimol, 2001).

A descoberta e a identificação do agente etiológico da FA só ocorreram em 1927, quando trabalhadores da Comissão de Febre Amarela do Oeste da África da Fundação Rockefeller demonstraram a transmissão da infecção de um paciente ganês, de 28 anos, chamado Asibi, a um macaco rhesus e a subsequente passagem entre macacos. *Asibi* é a cepa original da vacina 17D contra a FA, desenvolvida em 1937 na Fundação Rockefeller, em Nova York (Schoub & Blackburn, 1995; Monath, 2004).

No Brasil, no início do século XX, a doença já era endêmica em vários centros urbanos, sendo que a primeira epidemia de FA descrita no país ocorreu na cidade de Recife em 1685 (quadro 1.1). Entre 1928 e 1929, a cidade do Rio de Janeiro foi assolada por uma epidemia, com mais de 700 casos registrados e 435 óbitos. Com as vigorosas campanhas de combate ao mosquito vetor urbano e a implementação da vacinação, esta foi a última epidemia em um grande centro urbano; possibilitando, a partir dessas medidas, controlar a forma urbana da doença. De fato, os últimos casos relatados da modalidade urbana da FA no Brasil ocorreram em 1942 no Acre. Assim, no final da década de 50, o Brasil e outros países sul-americanos foram considerados livres do mosquito vetor urbano (Benchimol, 2001).

Nos anos de 1967 e 1976 ocorreram reintroduções do mosquito vetor em estados do Brasil (Pará, Bahia e, posteriormente, em quase todos os estados brasileiros) e em países da América do Norte e Central (Benchimol, 2001; Gubler, 2004). Recentemente, o Ministério de Saúde Pública e Bem Estar Social do Paraguai confirmou 16 casos de FA, incluindo 3 mortes, onde 9 desses casos ocorreram na área urbana do município de San Lorenzo, aproximadamente a 15 Km da capital Assunção (OPAS, 2008).

Entre 1990 e 1993, todos os casos registrados de FA no Brasil ocorreram nas regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste (Vasconcelos *et al.*, 2004). No início de 2001, na região centro-oeste do Estado de Minas Gerais, ocorreu uma epidemia de febre amarela silvestre (FAS), onde foram registrados 32 casos e 16 óbitos. No início de 2003 foi descrito um novo surto da doença silvestre em regiões rurais de Minas Gerais, com 63 casos confirmados, sendo que 23 destes foram a óbito (SVS, 2003). Entre 2007 e janeiro de 2008, foram registrados 20 casos confirmados da FAS, dos quais 10 evoluíram para óbito. Os prováveis locais destes casos ocorreram em áreas silvestres de Goiás, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal. Nos

meses de fevereiro e março de 2009, no Estado de São Paulo, registrou-se um total de 22 casos confirmados e 9 mortes por FAS (SVS, 2008a, 2009). O quadro 1.1 resume a história da FA no Brasil.

**Quadro 1.1:** Resumo da história da FA no Brasil (Fontes: Funasa, 1999; SVS, 2003, 2008a, 2009).

1685	Primeiro relato de epidemia de FA no Brasil (Recife/PE).
1691	Primeira campanha sanitária oficial no BR (Recife/PE).
1849	Reaparecimento da FA em Salvador/BA, com 2800 mortes registradas. Instalação do <i>Aedes aegypti</i> no Rio de Janeiro – 1ª epidemia da doença no Estado, com 9600 casos e 4160 mortes.
1850 a 1899	Propagação do <i>Aedes aegypti</i> pelo país – epidemias em quase todas as províncias do Império (desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul).
1903	Oswaldo Cruz é nomeado Diretor-Geral de Saúde Pública e inicia a luta contra a doença, criando o Serviço de Profilaxia da Febre Amarela.
1909	A doença é eliminada da capital federal (RJ).
1919	Surtos de FA em 6 estados do nordeste. Instalação do Serviço Antiamarílico no Recife.
1920	Diagnosticado o primeiro caso de FAS no BR (Pernambuco).
1928	Nova epidemia da doença no RJ. Clementino Fraga organiza uma nova campanha contra a FA.
1931	Governo brasileiro assina convênio com a Fundação Rockefeller (renovado, sucessivamente, até 1939). O Serviço de Febre Amarela é estendido a todo o território brasileiro.
1932	Primeira epidemia de FAS, no Vale do Canaã (Espírito Santo). Instituiu-se o Serviço de Viscerotomia, através de Decreto Federal.
1937	Advento e uso da vacina antiamarílica no Serviço de Profilaxia da FA.
1940	É proposta a erradicação do <i>Aedes aegypti</i> como resultado do sucesso alcançado pelo Brasil na erradicação do <i>Anopheles gambiae</i> , transmissor da malária.
1942	Últimos 3 casos de FA urbana no BR (Acre).
1950	A OPAS recomenda aos países membros a erradicação continental do <i>Aedes aegypti</i> .
1958	A XV Conferência Sanitária Pan-Americana, realizada em Porto Rico, declara que o <i>Aedes aegypti</i> está erradicado do território brasileiro.
1967	Reintrodução do <i>Aedes aegypti</i> na cidade de Belém (Pará).
1972/1973	Epidemia de FAS no Estado de Goiás (71 casos e 44 óbitos).
1973	O <i>Aedes aegypti</i> é, mais uma vez, considerado erradicado do território brasileiro.
1976	Nova reintrodução do vetor no Brasil, na cidade de Salvador/BA.
1978 a 1984	Registrada a presença do vetor em quase todos os estados brasileiros, com exceção da região amazônica e extremo sul do país.
1986	É encontrado pela 1ª vez no BR o <i>Aedes albopictus</i> , em terreno da UFRRJ (município de Itaguaí).
1995	O <i>Aedes aegypti</i> foi identificado em 25 dos 27 Estados, exceto Amazonas e Amapá.
1997	Presença do mosquito vetor em todos os estados do Brasil, abrangendo 2.719 municípios.
2001 e 2003	Surtos de FAS em Minas Gerais.
2009	Casos de FAS continuam sendo registrados em áreas silvestres de Estados do BR (Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo) e Distrito Federal.

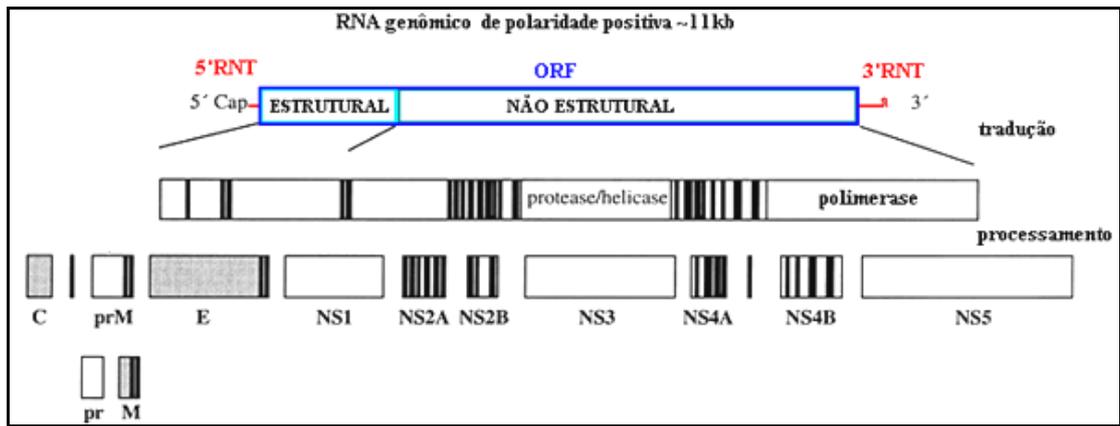
As descobertas no início do século XX de que o *Aedes aegypti* era responsável pela transmissão e que a doença poderia ser evitada pelo controle dos mosquitos vetores, bem como o desenvolvimento de vacinas na década de 1930, reduziram o medo associado à doença e o seu impacto na saúde pública. Hoje, apesar dos últimos casos relatados da FA urbana (FAU) no Brasil terem ocorrido em 1942, há um grande receio pela reurbanização da doença devido à presença do *Aedes aegypti* em vários centros urbanos do país (Benchimol, 2001; Gubler, 2004). Ademais, a FAS permanece endêmica, destacando-se como um problema de saúde pública, especialmente em regiões de países tropicais da América do Sul e da África (Monath, 2001).

### **1.1.3 – O agente etiológico**

Os arbovirus – vírus de artrópodes – são mantidos na natureza em um ciclo de transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados suscetíveis e artrópodes hematófagos, tais como mosquitos e carrapatos. Esses vírus se multiplicam e induzem viremia nos hospedeiros vertebrados, se replicam nos tecidos de artrópodes que se alimentam dos vertebrados infectados e, após um período de incubação extrínseca, são passados para novos hospedeiros vertebrados através da picada do artrópode. Diferenças nas características morfológicas, antigênicas, bioquímicas e genéticas são utilizadas para separar os arbovirus em família, gênero, subgrupos, complexos antigênicos, espécie, subtipos e variedades em uma ordem crescente de parentesco (Calisher *et al.*, 1999).

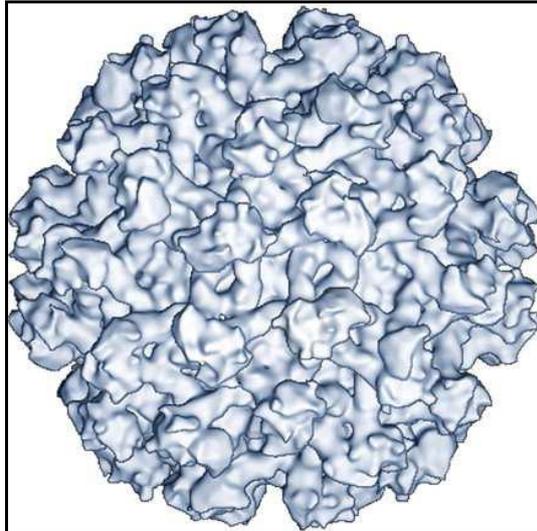
A família *Flaviviridae* é composta por, pelo menos, 70 vírus e estes são responsáveis por uma variedade de doenças em homens e animais. Esta família é subdividida em 3 gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. O gênero *Flavivirus* integra importantes patógenos virais humanos, como os vírus da febre amarela, dengue e encefalite japonesa, que são arbovirus (Schoub & Blackburn, 1995; Calisher *et al.*, 1999).

O vírus da FA é o protótipo do gênero *Flavivirus* (do latim *flavus* = amarelo). Apresenta um genoma de 10.862 nucleotídeos, o qual possui uma única região codificante, com cerca de 10.233 nucleotídeos para a formação das proteínas virais estruturais e não-estruturais. Essa região é flanqueada por duas regiões não codificantes de tamanhos variáveis: uma estrutura CAP na extremidade 5' (118 nucleotídeos) e uma extremidade 3' não poliadenilada (511 nucleotídeos) (Figura 1.1). As regiões não codificantes, embora não codifiquem a formação das proteínas virais, são importantes para a regulação e expressão do vírus (Rice *et al.*, 1985; Chambers *et al.*, 1990; Bonaldo *et al.*, 2006).



**Figura 1.1:** Tradução e processamento da poliproteína dos *Flavivirus*. O genoma viral é representado com as regiões não-traduzidas (RNT) 5' e 3' e a fase de leitura aberta (ORF, do inglês *Open Reading Frame*) de 10.862 nucleotídeos. Nesta fase de leitura estão codificadas, no sentido 5' → 3', as três proteínas estruturais (C, prM e E) e os sete genes para as proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Adaptado de Lindenbach & Rice, 2001.

O vírus da FA é esférico e apresenta um capsídeo de simetria icosaédrica que contém um RNA de fita simples (Figura 1.2). Esta única molécula de RNA, que apresenta polaridade positiva, funciona como RNA mensageiro e sua tradução na célula infectada resulta na síntese de uma poliproteína precursora de 3411 aminoácidos a qual, uma vez clivada por processamento proteolítico, gera 10 polipeptídeos virais específicos: proteína C do capsídeo (12-14 KDa), proteína M da membrana e sua precursora prM (18-22 KDa), proteína E que dá origem ao envelope (52-54 KDa) e as proteínas não-estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (figura 1.1). As proteínas estruturais – C, prM/ M e E – formam a estrutura básica da partícula viral juntamente com o seu genoma e são as responsáveis pela reação do organismo humano durante uma infecção (produção de anticorpos contra as glicoproteínas do envelope e anticorpos neutralizantes contra a proteína C do capsídeo). Já as proteínas não-estruturais (numeradas por ordem de síntese de 1 a 5) são responsáveis pelas atividades reguladoras e de expressão do vírus incluindo a replicação, a virulência e a patogenicidade (Rice *et al.*, 1985; Chambers *et al.*, 1990; Bonaldo *et al.*, 2006).



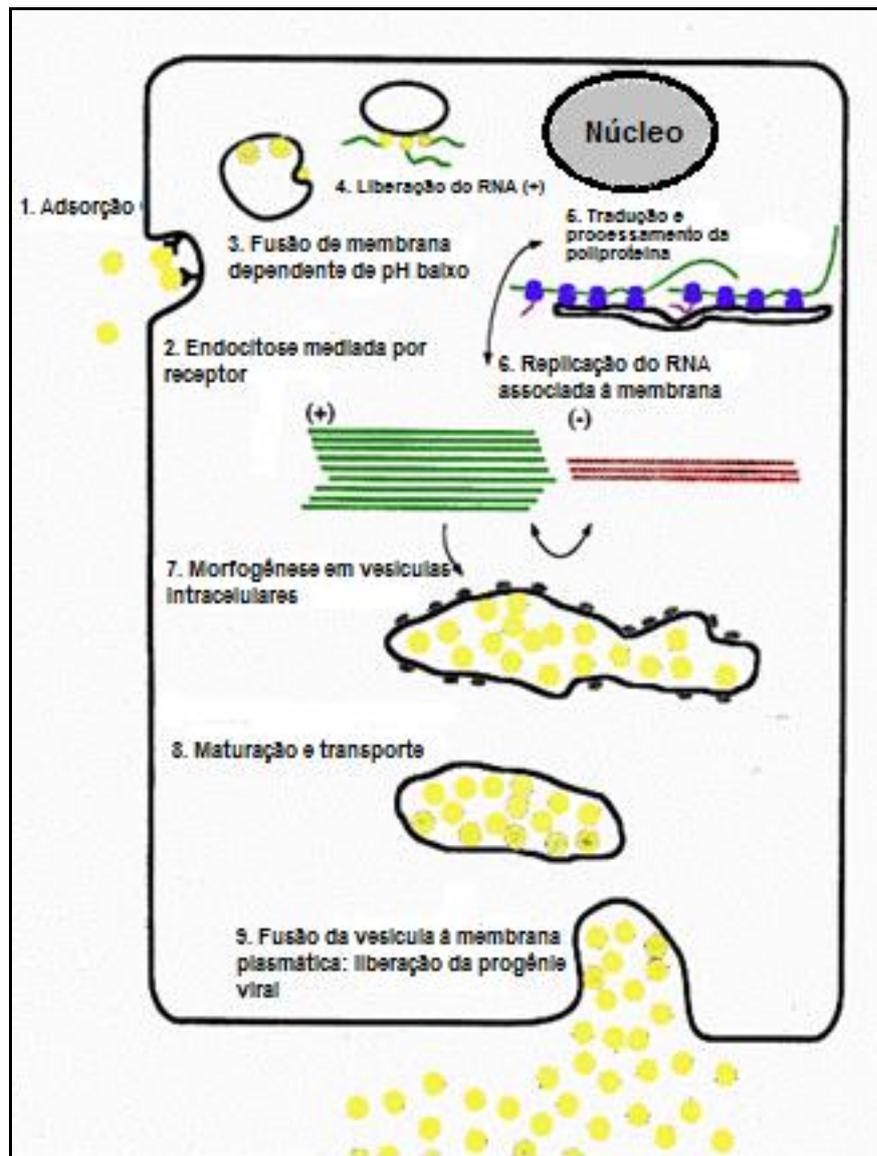
**Figura 1.2:** Reconstrução de imagem de criomicroscopia eletrônica de uma forma imatura do vírus da FA 17D. A partícula íntegra mede cerca de 40-50nm de diâmetro. Fonte: Heather, 2005.

O nucleocapsídeo (genoma viral protegido pelo capsídeo) tem um diâmetro que pode variar entre 25-40nm e é coberto por um envoltório bilaminar de natureza lipoprotéica, originário da célula hospedeira (envelope). A partícula íntegra (nucleocapsídeo envelopado) mede cerca de 40-50nm (Rice *et al.*, 1985; Chambers *et al.*, 1990; Vasconcelos, 2003).

Há pouco tempo não se conhecia a origem do vírus da FA; não se sabia se ele já existia na América antes do comércio de escravos vindos da África. Mas, o sequenciamento deste vírus mostrou que as amostras de FA da América perderam parte de uma sequência repetitiva do genoma na região não codificante 3', o que não ocorre nas amostras africanas. Esses dados sugerem que o vírus se originou na África (Wang *et al.*, 1996; Mutebi *et al.*, 2001; Vasconcelos, 2003).

A primeira etapa da infecção viral envolve a interação do vírus com a célula hospedeira. Acredita-se que na ligação e captura dos *Flavivirus* ocorra endocitose mediada por receptores celulares específicos para proteínas do envelope viral. Os vírus são retomados em vesículas revestidas de clatrina e a fusão do envelope viral com a membrana celular entrega o nucleocapsídeo ao citoplasma, onde ocorre a tradução do RNA genômico (de polaridade positiva). A poliproteína formada é clivada por uma combinação de proteases virais e da célula hospedeira. As fitas complementares sintetizadas (de polaridade negativa) servem como modelos para mais fitas da progênie. O RNA mensageiro codifica para: replicase, helicase e outras enzimas requeridas para a replicação contínua; proteases

envolvidas no processo pós-traducional e proteínas estruturais para a montagem do vírion. A montagem das partículas virais ocorre em estreita associação com o retículo endoplasmático e, finalmente, são transportadas em vesículas intracelulares. Essas vesículas seguem a via secretória do hospedeiro, fusionam com a membrana plasmática e liberam as partículas virais maduras no meio extracelular (Lindenbach & Rice, 2001; Monath, 2004). A figura 1.3 é um esquema representativo do ciclo replicativo do vírus da FA e de outros *Flavivirus*.



**Figura 1.3:** Esquema das etapas do ciclo de replicação dos *Flavivirus*. Adaptado de Monath, 2004.

### 1.1.4 – Hospedeiros naturais, vetores e ciclos de transmissão

A FA é uma infecção zoonótica, mantida na natureza por primatas não humanos e mosquitos com atividade diurna (Monath, 2001).

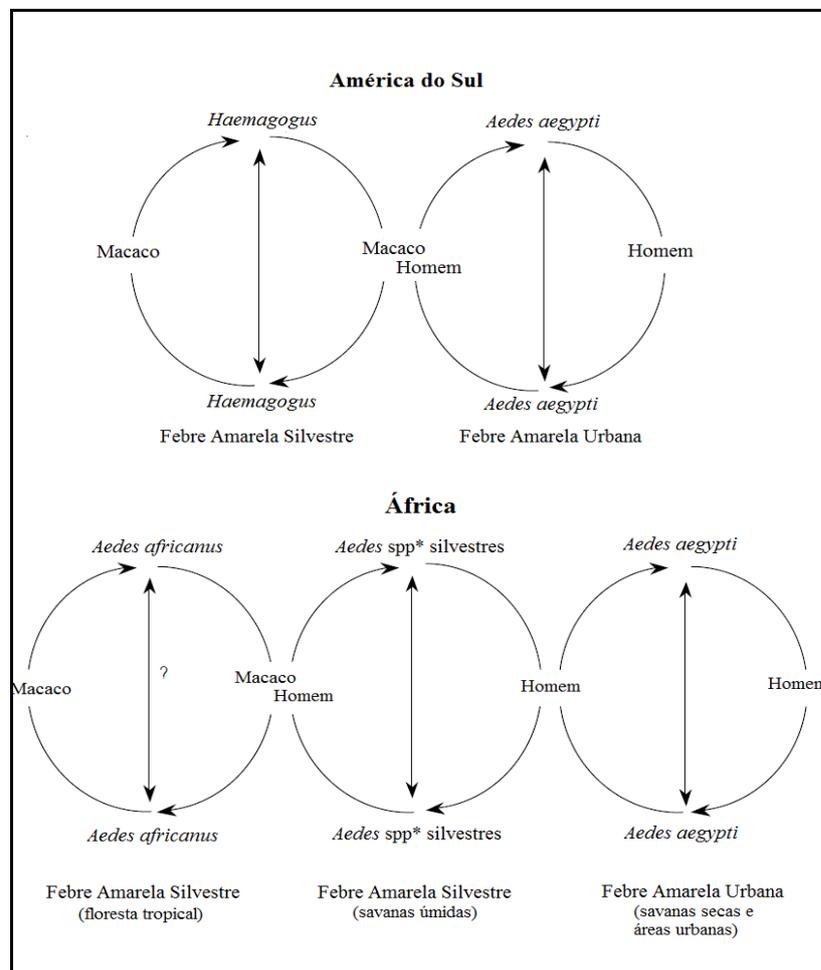
Tanto na África quanto na América do Sul, os hospedeiros silvestres primários do vírus da FA são primatas não humanos, em especial macacos. A viremia desenvolvida por macacos é sempre de curta duração (geralmente de dois a cinco dias) e, após a infecção, têm imunidade ao longo da vida. Macacos que ficam nas copas das árvores da floresta como, por exemplo, *Cercopithecus mitis*, são os principais hospedeiros vertebrados no ciclo silvestre, enquanto aqueles que descem ao nível do solo (como do gênero *Cercocebus*) ou passam da floresta para as plantações (como *Cercopithecus aethiops*) são o elo entre o ciclo silvestre e o homem – único hospedeiro da FAU. Esta modalidade da doença é transmitida aos seres humanos através da picada de mosquitos infectados com o vírus. O período de incubação varia de três a sete dias e os mosquitos podem ser infectados alimentando-se de pacientes durante os primeiros três a quatro dias da doença, quando o vírus é circulante no sangue (OMS, 2004).

Os mosquitos, além de serem transmissores, são os reservatórios do vírus, pois, uma vez infectados, assim permanecem por toda vida. Em contrapartida, os macacos e os homens, ao se infectarem, morrem ou curam-se, tornando-se imunes para sempre. Os principais vetores do vírus da FA na África são mosquitos do gênero *Aedes*: *A. aegypti*, *A. africanus*, *A. opok*, *A. luteocephalus*, *A. simpsoni*, *A. furcifer* e *A. taylori*. Na América do Sul, além do *A. aegypti*, outros mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* mostram-se responsáveis pela transmissão da arbovirose, tais como: *H. janthinomys*, *H. albomaculatus*, *H. leucocelaenus*, *S. chloropterus*, *S. soperi* e *S. cyaneus* (Vasconcelos, 2003; Monath, 2004).

Vetores do gênero *Aedes* podem ser classificados em três categorias de acordo com o seu contato com seres humanos: doméstico, ou seja, em torno das famílias (principalmente *A. aegypti*); silvestre (todas as outras espécies); e semi-doméstico (vetores silvestres que podem adquirir hábitos domésticos, como as espécies *A. furcifer*, *A. africanus* e *A. luteocephalus*). A forma urbana da doença, tanto na África quanto na América do Sul, é transmitida pelo *Aedes aegypti* (mosquito vetor que se reproduz em águas limpas). Já os vetores da FA em áreas de floresta africana são o *Aedes africanus* e outras espécies de *Aedes*, enquanto na América do Sul os mosquitos vetores da FAS são dos gêneros *Haemagogus* (principalmente, *H. janthinomys*) e *Sabethes* (Vasconcelos, 2003; OMS, 2004).

A figura abaixo (1.4) apresenta os ciclos de transmissão do vírus da FA na África e na América do Sul. No ciclo silvestre os vírus permanecem em mosquitos que se criam em buracos de árvores. A doença é transmitida entre macacos e outros pequenos primatas. Os

humanos são infectados quando eles entram na floresta e são picados por mosquitos portadores do vírus. Em locais onde vetores silvestres estão presentes em alta densidade, como na zona de savanas da África, os seres humanos podem servir como o hospedeiro principal na transmissão epidêmica. No ciclo urbano, um mosquito doméstico infectado, *Aedes aegypti*, transmite o vírus diretamente de humano para humano. Durante a estação seca o vírus é mantido através da transmissão transovariana entre os mosquitos. Ovos contendo vírus sobrevivem em buracos de árvores secas e mosquitos da progênie infecciosa saem dos ovos quando as chuvas retornam (Monath, 2001; OMS, 2004).

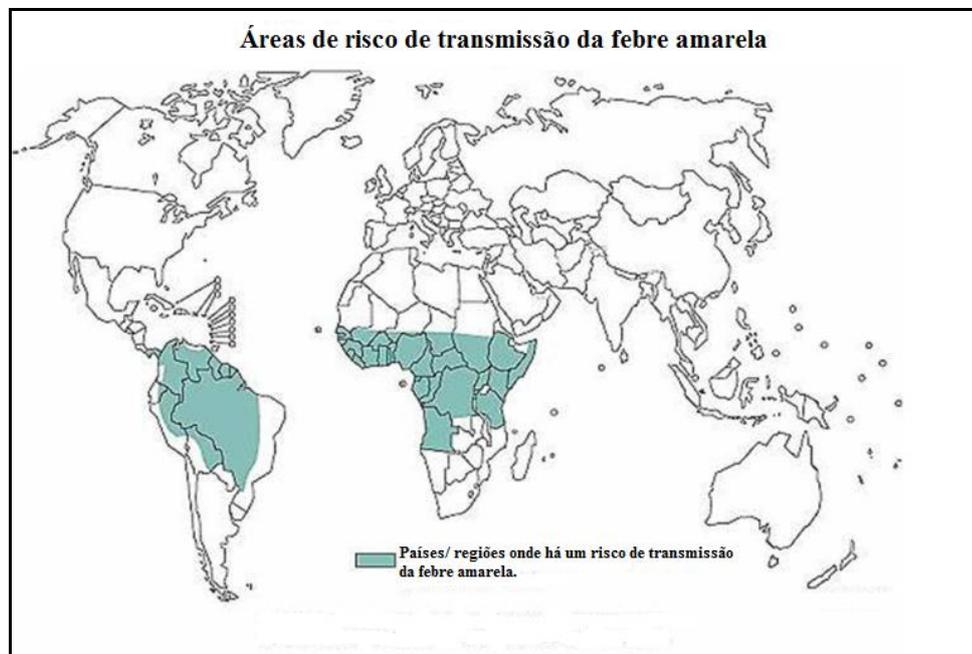


**Figura 1.4:** Ciclos de transmissão do vírus da FA na América do Sul (em cima) e na África (embaixo). Transmissão transovariana é indicada por setas verticais mostrando a transferência do vírus entre mosquitos. \*Espécies do oeste da África: *A. furcifer*, *A. taylori*, *A. luteocephalus*, *A. africanus*, *A. opok*, *A. vittatus* e *A. metallicus*. Leste da África: *A. bromeliae* e *A. africanus*. Adaptado da WHO, 2004.

### 1.1.5 – Distribuição geográfica e dados epidemiológicos

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), ocorrem, a cada ano, cerca de 200.000 casos de FA e 30.000 mortes devido à doença, embora as notificações oficiais sejam menores. Durante as epidemias em populações não vacinadas, as taxas de letalidade podem exceder 50% e não existe nenhum tratamento específico para a doença além de cuidados de suporte (OMS, 2010).

A doença é encontrada nas regiões tropicais da África e América do Sul (figura 1.5). Mas, a grande maioria dos casos e das mortes por FA ocorre na África subsaariana, onde a doença é um problema de saúde pública, sendo endêmica em 32 países. Com uma população total de 610 milhões de pessoas, entre as quais mais de 219 milhões vivem em áreas urbanas, a África ainda tem experiências de surtos periódicos de FAU. Na Ásia a doença nunca foi relatada, mas, caso seja importada acidentalmente, o potencial para surtos existe, pois o mosquito vetor está presente (OMS, 2010). Na América do Sul, nos últimos 20 anos, a ocorrência da FA tem sido registrada em 9 países: Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Peru, Venezuela, Guiana Francesa, Paraguai e Argentina (SVS, 2010).

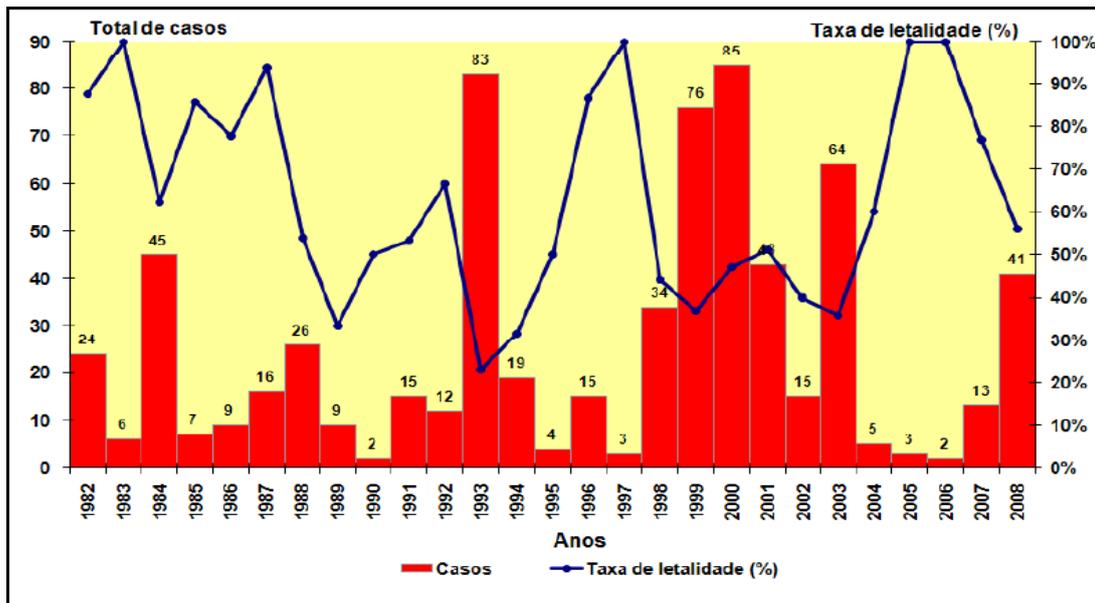


**Figura 1.5:** Áreas de risco de transmissão da FA no mundo. Fonte: OMS, 2010 (disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/yellowfev/impact/en/>).

Embora a doença geralmente cause apenas casos esporádicos e pequenos surtos, quase todos os grandes centros urbanos nos trópicos americanos foram reinfestados com o *Aedes aegypti*. Ademais, observa-se um crescimento demográfico nas zonas enzoóticas, além da baixa cobertura vacinal, tornando moradores urbanos mais vulneráveis à doença. A situação torna-se ainda mais complicada pelo aparecimento de resistência do *Aedes aegypti* aos inseticidas, relaxamento das medidas de luta contra este mosquito em algumas regiões, além da dificuldade operacional para desenvolver ações de vigilância e combate ao vetor e o custo crescente dessas medidas. Assim, considera-se crescente o risco de re-emergência da FAU. A América Latina está agora em maior risco de epidemias urbanas do que em qualquer momento nos últimos 50 anos (Funasa, 1999; OMS, 2010).

Na América do Sul, a FA vem sendo registrada a cada ano. Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), todos os anos entre 1960 e 2007 foram registrados casos de FA nas Américas, chegando a mais de 500 casos no ano de 1995. No período de 1989 a 1995, Bolívia, Equador, Peru, Colômbia e Brasil somaram 1.373 casos registrados da modalidade silvestre da FA, com 762 óbitos e letalidade de 56%. Em 1998, a Venezuela notificou um surto de FAS na área indígena Yanomami, após 11 anos sem registro da doença; e nos anos de 2002 a 2005 também notificou casos humanos. Dados mais recentes da OPAS mostram que Perú, Colômbia, Brasil e Bolívia vêm relatando casos da doença todos os anos no período de 2000 a 2009 (principalmente nos três primeiros países citados) (Funasa, 1999; SVS, 2008b; OPAS, 2009).

No período de 1989 a 2008, foram registrados no Brasil 540 casos de FA com 236 óbitos. O maior número de registros foi em Minas Gerais (n = 109), seguido de Goiás (n = 90) e Maranhão (n = 90), Pará (n = 83), e Amazonas (n = 43) (Funasa, 1999; SVS, 2010). A figura abaixo (1.6) apresenta todos os casos registrados por ano da FA e as taxas de letalidade, no período de 1982 a 2008 no Brasil. A alta letalidade em alguns anos sugere subnotificação de casos.



**Figura 1.6:** Distribuição da FA no Brasil. Série histórica de casos e taxas de letalidade – 1982 a 2008 (dados até a Semana Epidemiológica 43/08). Fonte: SVS, 2008b (disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Febre%20Amarela-site-SVS-31out2008.pdf>).

### 1.1.6 – Prevenção e controle da doença

A vacinação é a maneira mais eficaz de prevenir e controlar a FA. Nas áreas de alto risco, onde a cobertura vacinal é baixa, o reconhecimento imediato e o controle de surtos através da imunização são fundamentais para impedir uma epidemia. Assim, para evitar surtos em todas as regiões afetadas, a cobertura vacinal deve atingir pelo menos 60% a 80% de uma população em risco. Porém, poucos países na África atualmente apresentam este nível de cobertura (OMS, 2009).

A vacina contra a FA produzida (desde 1937) por Bio-Manguinhos (Fiocruz) foi obtida a partir da cepa atenuada 17D do vírus da FA, a qual é cultivada em ovos embrionados de galinhas livres de agentes patogênicos, de acordo com as normas estabelecidas pela OMS. A vacina é recomendada para pessoas residentes em áreas endêmicas ou que para lá viajam. O Ministério da Saúde, através do Programa Nacional de Imunizações (PNI), recomenda que a vacina seja aplicada a partir dos nove meses de vida, sendo importante o reforço de, no mínimo, dez em dez anos, principalmente para os residentes ou viajantes das regiões endêmicas (Monath, 2004; Romanos, 2008).

O vírus vacinal propagado em ovos de galinha fertilizados é extraordinariamente atenuado, mantendo sua imunogenicidade. As vacinas em uso atualmente – as subcepas derivadas 17D-204 e 17DD – representam as vacinas desenvolvidas até à data com o melhor desempenho, sendo consideradas seguras e altamente imunogênicas, induzindo a formação de

anticorpos protetores de longa duração. Um estudo comparativo realizado com as vacinas atenuadas das cepas 17DD e WHO-17D demonstrou taxa de soroconversão igual ou superior a 98% em indivíduos previamente soronegativos para as duas vacinas. A intensidade da resposta imune também foi semelhante para ambas as vacinas, variando de 14,5 a 18,6 UI/mL (Camacho *et al.*, 2004). A imunidade persiste por no mínimo 10 anos, e possivelmente por toda a vida (Monath, 2004). Ademais, estas vacinas atenuadas apresentam uma metodologia de produção bem definida e eficiente e um rigoroso controle de qualidade, além de serem baratas e administradas em uma única dose. Desde 1945, o uso do vírus 17D foi estimado em mais de 200 milhões de doses, com um excelente registro de segurança (Schoub & Blackburn, 1995; Galler *et al.*, 1998; Marchevsky *et al.*, 2003).

O controle de mosquitos vetores também representa uma medida fundamental para controlar a doença. Esse controle deve ser feito pela eliminação dos vetores artrópodes empregando medidas como: evitar a picada de mosquitos com o uso de repelentes, mosquiteiros e telas protetoras; eliminar os potenciais criadouros do mosquito através da vedação ou eliminação de qualquer tipo de depósito de água, como caixas d'água, tanques, tinas, poços e fossas; evitar o acúmulo de lixo para reduzir os possíveis criadouros de mosquitos; controle químico das larvas do mosquito vetor (larvicidas); além das campanhas de educação em saúde informando às comunidades sobre as doenças transmitidas por mosquitos, bem como as medidas adequadas para combatê-los (Romanos, 2008).

A FA, o cólera e a peste são as três doenças sujeitas ao Regulamento Sanitário Internacional. A notificação internacional é compulsória para que as medidas preventivas sejam adotadas pelos países vizinhos e para proteger os viajantes e alertá-los sobre a necessidade de se vacinarem (Vasconcelos, 2003).

### ***1.1.7 – Resposta imune humoral do hospedeiro à doença***

A infecção com o vírus da FA ou a imunização com a respectiva vacina é seguida por uma rápida resposta imune específica. Anticorpos neutralizantes, anticorpos citolíticos contra proteínas virais na superfície de células infectadas, ADCC (Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo) e células T citotóxicas são presumidas para mediar a remoção de infecção primária (Monath, 2001, 2004).

A resposta humoral para o tipo selvagem do vírus da FA é caracterizada pelo aparecimento de anticorpos IgM – os quais têm como propriedades serem receptores de antígenos de células B virgens e ativadores do Complemento (Abbas *et al.*, 2008) – durante a primeira semana da doença, chegando ao seu nível máximo durante a segunda semana e declínio rápido em 30 a 60 dias. Anticorpos com atividade biológica (inibição da

hemaglutinação e neutralização) aparecem rapidamente, normalmente até o quinto dia da doença. Contudo, as respostas dos anticorpos de inibição da hemaglutinação e neutralizantes nem sempre estão unidas, refletindo os diferentes epítomos para esses anticorpos no envelope viral (Theiler & Casals, 1958; Heinz, 1986; Monath, 2004). O pico de anticorpos inibidores da hemaglutinação ocorre entre 30 e 60 dias após a infecção e uma diminuição significativa do título ocorre durante os 6 meses subsequentes. Já os anticorpos neutralizantes persistem por muitos anos, se não toda a vida, após a infecção natural da FA, além de fornecerem completa proteção contra a doença no caso de uma re-exposição ao vírus. Os anticorpos de fixação do Complemento aparecem durante a segunda semana após o início da doença, aumentam durante o período de convalescença e declinam após 4 e 12 meses (Monath, 2001, 2004).

As respostas dos anticorpos seguidas de FA primária são específicas para o antígeno da FA. Essa especificidade diminui com a maturação de afinidade dos anticorpos e reações cruzadas com *Flavivirus* relacionados aparecem durante a segunda semana após o início da doença. Indivíduos com imunidade prévia de *Flavivirus* heterólogos desenvolvem uma ampla resposta cruzada de anticorpos (Theiler & Casals, 1958; Monath, 2004).

Dentre os testes disponíveis para a avaliação da resposta imune específica do hospedeiro, o de inibição da hemaglutinação apresenta-se como o teste menos específico, o teste de fixação do Complemento apresenta especificidade intermediária e o teste de neutralização é considerado o mais específico. O ELISA de captura para IgM (MAC-ELISA) é específico em casos de infecção primária, mas reações cruzadas podem ocorrer ao longo do tempo e em casos de exposição prévia a outros *Flavivirus* (Monath, 2004).

### ***1.1.8 – Testes sorológicos para febre amarela***

Nas últimas décadas, o diagnóstico das infecções virais vem posicionando-se como uma importante ferramenta na medicina, contribuindo de maneira rápida e precisa na identificação de patógenos e direcionamento do tratamento, além de sua importância na saúde pública. Uma importante característica do diagnóstico virológico moderno é o uso de múltiplos métodos na detecção das infecções virais, incluindo o isolamento viral, a detecção de antígenos e anticorpos e a amplificação de ácido nucléico (Santos & Benati, 2008).

O diagnóstico para a FA pode ser feito através do isolamento e identificação viral, testes sorológicos para pesquisa de anticorpos e detecção do ácido nucléico viral. Os testes sorológicos são amplamente utilizados, destacando-se os clássicos testes de neutralização (TN); inibição da hemaglutinação (IH) ou fixação do Complemento (FC); assim como os ensaios de imunofluorescência indireta (IFI) ou imunoenzimático (ELISA) para a detecção de

anticorpos IgG ou IgM (Schoub & Blackburn, 1995; Romanos, 2008). Os testes de neutralização serão abordados por último, já que um deles é objeto do presente estudo.

No teste IH, o vírus da FA – com capacidade hemaglutinante para hemácias de aves – é misturado ao soro do paciente. Sabendo-se que a capacidade de hemaglutinação do vírus é bloqueada pela reação do vírus com anticorpo específico, se o soro do paciente contém os anticorpos haverá a formação do complexo antígeno-anticorpo e, conseqüentemente, quando as hemácias forem adicionadas a este sistema não ocorrerá a hemaglutinação, confirmando a presença dos anticorpos específicos. Em contrapartida, na ausência de anticorpos contra o vírus, não há a formação do complexo antígeno-anticorpo e, portanto, haverá hemaglutinação induzida pelo vírus (teste negativo para a presença de anticorpos). A reação de IH detecta anticorpos totais (não faz distinção entre IgG e IgM) que aparecem na primeira semana após o início da doença. Uma importante limitação deste teste é a probabilidade de ocorrerem reações cruzadas com outros *Flavivirus*, dificultando a sua interpretação. Assim, IH é caracterizado como um teste pouco específico. Historicamente, o teste IH foi o primeiro ensaio utilizado para detectar anticorpos contra o vírus da FA, seguido pelo teste de neutralização (Groot & Ribeiro, 1962; Robertson, 1993; SVS, 2005; Santos & Benati, 2008).

O teste FC baseia-se no princípio de que o Complemento é um agente lítico do sistema imune, com capacidade de fixar-se a imunocomplexos (antígeno-anticorpo). Quando a reação FC é utilizada para a pesquisa de anticorpos no soro de paciente, é misturado a este soro o vírus da FA e o Complemento. Após incubação, adiciona-se a esta mistura um sistema revelador, composto por hemácias e anticorpos anti-hemácias, o qual funciona como um complexo antígeno-anticorpo. Se os anticorpos presentes no soro do paciente forem específicos para o vírus da FA, os complexos antígeno-anticorpo serão formados e o Complemento é fixado a eles. Desta forma, o Complemento não mais estará ativo ou disponível para atuar no complexo hemácia-anticorpo, e assim as hemácias permanecerão intactas e não sofrerão hemólise. Portanto, a ausência da hemólise indica a presença de anticorpos para FA no soro do paciente. Na ausência de anticorpos específicos para o vírus, não haverá a formação de imunocomplexos e o Complemento não será fixado, permanecendo livre e ativo para fixar-se ao sistema revelador. Conseqüentemente, a cascata do Complemento será ativada, resultando na lise das hemácias. Portanto, a presença de hemólise indica que o teste FC foi negativo; ou seja, ausência no soro de anticorpos específicos para o vírus da FA. O teste FC é menos sensível, porém mais específico que o IH. Anticorpos fixadores de Complemento aparecem mais tarde (durante a segunda semana após o início da doença) e podem declinar de forma relativamente rápida para baixos níveis de 6 a 12 meses após a infecção. Assim, a presença desses anticorpos geralmente indica uma infecção recente.

No entanto, em alguns estudos esses anticorpos têm demonstrado persistir em títulos moderados a altos por períodos prolongados (pelo menos 2 anos). A reação de FC, assim como IH, detecta anticorpos totais (Monath *et al.*, 1980; Robertson, 1993; SVS, 2005; Santos & Benati, 2008).

A técnica de imunofluorescência utiliza anticorpos marcados (conjugados) com corantes fluorescentes (por exemplo, isotiocianato de fluoresceína – FITC) para revelar a formação de imunocomplexos vírus-anticorpo. Para o diagnóstico de FA, a técnica de imunofluorescência utilizada é a indireta. Na detecção de anticorpos por IFI, o soro do paciente é adicionado a células infectadas fixadas a uma lâmina de microscópio. Após incubação, as lâminas são lavadas para a remoção dos possíveis anticorpos não ligados e, em seguida, um anticorpo anti-imunoglobulina conjugado é adicionado. Após nova incubação e lavagem, observa-se ao microscópio de fluorescência. Se no soro do paciente há anticorpos para o vírus da FA, o conjugado irá se ligar ao imunocomplexo formado e a fluorescência será observada. Na ausência de anticorpos específicos para o vírus não será observada fluorescência, representando o teste negativo. O IFI pode detectar tanto anticorpos IgG quanto IgM (dependendo do conjugado utilizado). Na infecção primária, anticorpos IgG são regularmente encontrados e a especificidade do teste IFI é comparável a obtida nos testes de FC e neutralização. Anticorpos IgM são altamente específicos, mas nem sempre são detectados por esta técnica devido à interferência de anticorpos IgG (Robertson, 1993; Niedrig *et al.*, 2008; Santos & Benati, 2008).

O ELISA é um ensaio imunoenzimático, baseado na detecção de imunocomplexos fixos em um suporte sólido, utilizando para isso anticorpo conjugado a uma enzima. Nos testes para detecção de anticorpos, primeiramente, o antígeno viral é fixado ao suporte sólido. Em seguida, adiciona-se o soro do paciente a ser testado. Após a lavagem desse sistema para a remoção do material que não reagiu, o conjugado (anticorpo anti-imunoglobulina humana conjugado com enzima) é adicionado. Após incubação e lavagem, o substrato é adicionado para que a enzima atue sobre ele. Se o paciente possui anticorpos para o vírus, o conjugado irá se ligar aos imunocomplexos formados e haverá mudança de cor devido à atuação da enzima sobre o substrato (teste positivo). Se não há anticorpos específicos, o conjugado não se ligará e será removido na etapa de lavagem; logo, não haverá mudança de cor (teste negativo). O resultado do teste é determinado por observação visual (avaliação qualitativa) ou por medida espectrofotométrica (avaliação quantitativa). O primeiro anticorpo em resposta à infecção por um arbovirus é predominantemente IgM, o qual é razoavelmente específico; no entanto, as reações cruzadas continuam a ser um problema de interpretação de diferentes infecções. O ELISA é um ensaio bastante sensível e pode detectar anticorpos específicos da classe IgM

(MAC-ELISA), indicando infecção recente. Estes anticorpos desenvolvem-se rapidamente a partir do 5º dia da infecção e geralmente podem persistir por 60 a 90 dias após o início da doença. O MAC-ELISA é o teste de eleição para triagem de casos, por ser sensível e dispensar coleta de duas amostras. Em áreas sem *Flavivirus*, este teste quando positivo é indicativo de FA. É importante ressaltar que a vacina contra a FA também induz a formação de anticorpos IgM. Em 1983, Deubel e colaboradores demonstraram que o ELISA para a detecção de anticorpos IgG (utilizando um antígeno viral específico para o vírus da FA) é mais sensível e mais específico do que os testes de FC e IH; e os resultados deste ELISA tiveram relação com os obtidos por neutralização (Deubel *et al.*, 1983; Nogueira *et al.*, 1992; Calisher *et al.*, 1999; SVS, 2005; Santos & Benati, 2008).

Anticorpos neutralizantes podem ser determinados por testes *in vivo* ou *in vitro*. Dentre as técnicas utilizadas para detecção desses anticorpos há o teste de proteção em camundongos e o teste de neutralização por redução de placas de lise (PRNT, do inglês *Plaque Reduction Neutralization Test*) em cultura de células. Independente da técnica utilizada, o teste de neutralização é fundamentado no princípio de que vírus infecciosos, quando reagem com o anticorpo específico, são neutralizados e, portanto, perdem a capacidade de infectar células permissivas (SVS, 2005; Santos & Benati, 2008).

#### ***1.1.8.1 – Testes de neutralização***

Em 1931, Sawyer e Lloyd descreveram um método para avaliar o poder protetor de soros contra FA, designado teste intraperitoneal de proteção em camundongos. Este consiste essencialmente na inoculação de camundongos por via intraperitoneal com vírus da FA juntamente com o soro a ser testado, além de uma injeção de solução de amido no cérebro do animal, causando um trauma cerebral para tornar os camundongos susceptíveis ao vírus. Assim, a presença ou ausência de anticorpos é demonstrada pela sobrevivência ou morte destes animais, respectivamente. Sawyer e Lloyd demonstraram que o teste é bastante sensível, concluindo que este método poderia ser utilizado para estudos epidemiológicos para determinar se indivíduos já haviam tido FA ou em testes para avaliar resposta vacinal (Sawyer & Lloyd, 1931).

No entanto, o teste intraperitoneal de proteção em camundongos apresentava desvantagens, como: (i) necessidade de um grande volume de soro para a realização de um único teste, o que dificultava estudos com amostras de soros pequenas, tais como são obtidas de animais de pequeno porte; (ii) necessidade de uma maior quantidade de vírus; e (iii) o uso de uma injeção de amido suplementar, que não somente aumenta a mortalidade devido à manipulação como também aumenta o trabalho e o tempo consumido. Estas desvantagens

foram superadas pelo teste intracerebral de proteção descrito, por exemplo, por Theiler em 1933 e por Bugher em 1940. Esta metodologia consiste na neutralização *in vitro* seguida da inoculação diretamente no cérebro do animal, o que requer quantidades menores de vírus e soros comparadas com as dosagens necessárias para o sucesso do teste intraperitoneal, além da aplicação de uma única injeção. Paralelamente aos estudos com testes de proteção em camundongos por via intracerebral, em 1943, Whitman, com o objetivo de desenvolver uma metodologia em camundongos que pudesse ser realizada com uma única injeção e que exigisse volumes pequenos de soro e de vírus por teste, refinou o teste intraperitoneal de proteção em camundongos, utilizando animais neonatos (Whitman, 1943).

É importante destacar que os testes de proteção em camundongos foram muito utilizados em estudos para avaliar a potência e a imunidade protetora induzida pelas vacinas contra FA, 17D e 17DD (Fox, 1943a, 1943b).

Em 1937, Theiler & Smith descreveram a adaptação do cultivo *in vitro* da cepa 17D para culturas de tecidos de embriões de galinha. Dulbecco, em 1952, demonstrou que quando uma monocamada pré-formada de fibroblastos de embrião de galinha (CEF, do inglês *Chick Embryo Fibroblasts*) é exposta à infecção com uma diluição adequada do vírus da Encefalomielite Equina (*Western Equine Encephalomyelitis*) e depois incubada sob uma camada de ágar contendo nutrientes celulares, placas de lise ou plaques (áreas de destruição celular) são produzidos. Então, a presença de destruição celular ou a apresentação de um efeito citopático foi, normalmente, considerado ser um pré-requisito para o sucesso da técnica. Esses estudos permitiram que, em 1959, Porterfield descrevesse uma técnica de plaque *in vitro* para a titulação do vírus da FA em culturas de CEF. Neste método, a cultura de células é preparada a partir da coleta de embriões de galinha com 10 dias de incubação e, após processamento, a suspensão celular obtida é distribuída em placas de petri de aproximadamente 20cm<sup>2</sup> ou em garrafas de 100mL. As diluições seriadas dos soros e do vírus, assim como a etapa de neutralização são realizadas em tubos de ensaios, para a posterior adição das misturas vírus-soro nas culturas de células (pré-formadas em placas de petri) para que ocorra a adsorção. Neste trabalho, Porterfield concluiu que o teste de neutralização *in vitro* é um método sensível e específico para avaliar a presença de anticorpos contra FA em soros de indivíduos vacinados ou expostos naturalmente ao vírus. Além disso, o autor demonstrou que a técnica de plaque oferece uma precisão consideravelmente maior do que a obtida por titulação em camundongos. Outra vantagem é a obtenção dos resultados em 6 ou 7 dias, comparados com os 10, 18 ou até mesmo 21 dias dos testes realizados em camundongos (Porterfield, 1959).

Em 1969, De Madrid & Porterfield descreveram uma nova metodologia para o teste de neutralização *in vitro*, na qual células PS – uma linhagem celular estável de rim de suíno – infectadas em suspensão são incubadas sob condições que permitem a formação de uma monocamada em que o concomitante crescimento de vírus leva ao desenvolvimento de placas de lise induzidas pelo agente viral. A infecção generalizada da camada celular é impedida pela utilização de um gel semi-sólido produzido pela incorporação do sal de sódio de carboximetilcelulose (CMC) no meio. Os testes são realizados em placas de hemaglutinação de 80 orifícios. Esta metodologia representou um avanço em relação aos testes de proteção em camundongos e aos testes de neutralização *in vitro* anteriormente descritos. Este método é econômico tanto para quantidade celular quanto para o volume de meio e de soro. O princípio utilizado de células infectadas em suspensão elimina o tempo normalmente tomado para a formação de uma monocamada celular pré-formada antes da infecção, diminuindo o tempo total necessário para o ensaio de redução de placas de lise; e a presença de células se dividindo ativamente aumenta a sensibilidade do teste (De Madrid & Porterfield, 1969).

A não utilização de camundongos ou uma cultura primária de células foram fatores essenciais para a evolução do teste de neutralização *in vitro*, pois levou a uma redução considerável de custo, trabalho e tempo gastos para a realização completa do teste. A utilização de uma microplaca também representou um avanço da técnica, pois possibilita avaliar vários soros em um único teste. Assim, o teste de neutralização por redução de placas de lise – PRNT – que resultou desta longa evolução é o método de referência utilizado atualmente para a determinação do nível de anticorpos neutralizantes presentes em uma amostra de soro. A partir de uma quantidade conhecida de vírus, determina-se a capacidade de diluições do soro de um indivíduo impedir a formação de placas de lise em células suscetíveis (De Madrid & Porterfield, 1969; Niedrig *et al.*, 1999; Roehrig *et al.*, 2008).

O PRNT determina o parâmetro biológico de neutralização viral *in vitro* e é considerado o teste sorológico mais sensível e mais específico para FA, produzindo resultados quantitativos que se correlacionam com a proteção. Embora os anticorpos neutralizantes contra o vírus indiquem proteção para infecções por *Flavivirus* (Niedrig *et al.*, 1999; Camacho *et al.*, 2007; Roehrig *et al.*, 2008), não se conhecem os títulos medidos pelo PRNT que sejam considerados correlatos de proteção para FA.

O PRNT é um teste trabalhoso, requer equipamentos e insumos específicos e leva vários dias para sua finalização, não sendo, portanto, facilmente passível de produção elevada, tornando difícil a sua utilização em grande escala. Apesar das suas limitações e de testes mais recentes estarem sendo desenvolvidos para a detecção de anticorpos neutralizantes, o PRNT continua sendo considerado o método de referência para a análise da resposta imune protetora

após a vacinação. Isto se deve, principalmente, à capacidade deste método detectar os anticorpos neutralizantes, os quais aparecem precocemente, permanecem por muitos anos e são protetores, reduzindo ou eliminando a infecciosidade do vírus (Niedrig *et al.*, 1999; SVS, 2005; Niedrig *et al.*, 2008; Roehrig *et al.*, 2008).

## 1.2 – Conceitos Básicos na Avaliação do Desempenho de um Teste Diagnóstico

No desenvolvimento de um novo teste diagnóstico se faz necessário demonstrar a sua utilidade, e para isso é importante focar em questões como a confiabilidade do teste e a sua acurácia, além da aplicação prática e efeitos nas decisões clínicas e resultados desse teste. Respostas favoráveis a cada um desses pontos são necessárias, porém insuficientes para indicar a realização de determinado teste. Por exemplo, se o teste não fornece resultados consistentes quando realizado por operadores diferentes ou em pessoas diferentes, dificilmente será útil (Hatanaka & Benseñor, 2005).

A acurácia de um teste diagnóstico se refere à capacidade deste em discriminar entre aqueles que têm e os que não têm a condição de interesse, isto é, a frequência com que o teste acerta o resultado tanto para indivíduos com a doença como para aqueles sem a doença. A acurácia serve-nos de instrumento na constatação do grau de importância do teste em estudo. Antes, no entanto, de estabelecermos a acurácia do teste, há que se estar certo quanto à sua confiabilidade, ou seja, a capacidade de um teste produzir resultados consistentes (similares) quando repetido por diferentes observadores e instrumentos, em tempos e lugares diferentes. Reprodutibilidade e precisão são outras palavras utilizadas para designar esta propriedade. A confiabilidade é pré-requisito, mas não garante a acurácia do teste (Jekel *et al.*, 1999; Hatanaka & Benseñor, 2005; Leeflang *et al.*, 2008).

A confiabilidade intraobservador (ou repetibilidade) se refere aos resultados de testes mutuamente independentes, obtidos com o mesmo método de ensaio, de material idêntico, por um mesmo laboratório/ operador e usando o mesmo equipamento em intervalos de tempo pequenos. A confiabilidade interobservador (ou reprodutibilidade) se refere aos resultados obtidos com o mesmo método de ensaio e material idênticos, mas por laboratórios/ operadores diferentes e usando equipamentos diferentes, sendo os testes executados com maiores intervalos de tempo entre um e outro. Uma importante questão para a medicina clínica e a pesquisa é o grau no qual observações diferentes de um mesmo fenômeno diferem. Se existe concordância intraobservador ou interobservador, os dados no estudo podem ser considerados fidedignos (confiáveis). No entanto, confiança não é prova de validade, pois dois observadores podem chegar aos mesmos resultados, mas estes estarem errados. E não é

incomum a concordância imperfeita entre observadores, como também não é difícil observar o mesmo operador discordando dos seus próprios resultados realizados em ocasiões diferentes (Lopes, 2003).

Para a avaliação da confiabilidade de um teste podemos calcular o estimador Kappa ou o Coeficiente de Correlação Intraclasse. Se o teste usa uma variável dicotômica (duas categorias de resultados; por exemplo, positivo e negativo), os resultados podem ser colocados em uma tabela padrão 2 x 2, de maneira que as concordâncias observada e esperada possam ser calculadas; e, a partir delas, determinar o estimador Kappa ( $\kappa$ ), o qual relaciona a proporção de concordâncias observadas ( $P_o$ ) com as esperadas pelo acaso ( $P_e$ ) (quadro 1.2). Essa medida de concordância obedece a um intervalo de -1 (quando a discordância é perfeita), passando pelo zero, até +1 (concordância perfeita) (Cohen, 1960; Hatanaka & Benseñor, 2005).

**Quadro 1.2:** Medida de concordância Kappa (Cohen, 1960).

$$K = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

O Coeficiente de Correlação Intraclasse (CCI) é uma estimativa da fração da variabilidade total de medidas devido a variações entre os indivíduos. O CCI é equivalente ao Kappa para variáveis contínuas e varia entre 0 e 1; quanto maior o CCI (mais próximo de 1), menor a contribuição dos erros no processo de medida na variação total (Mcgraw & Wong, 1996).

O resultado de um teste diagnóstico pode nos fornecer 4 possíveis interpretações: 1. verdadeiro-positivo, quando positivo na presença da doença; 2. falso-positivo, se o teste revelar-se positivo em paciente sem a doença; 3. verdadeiro-negativo, ao excluir a possibilidade da doença em indivíduo que realmente não a possui; e 4. falso-negativo, ao descartar a doença quando ela está presente. Essas definições são importantes para as determinações de sensibilidade e especificidade, onde a acurácia do teste é mais frequentemente expressa por essas duas medidas. A sensibilidade caracteriza-se como a capacidade de um teste em detectar a doença em um indivíduo doente. Testes com uma boa sensibilidade são utilizados em situações em que se quer detectar todos os indivíduos com

determinada doença na população sem que haja perda de casos, já que a possibilidade de falso-negativos é menor. A especificidade pode ser definida como a capacidade do teste em excluir os indivíduos isentos da doença. Assim, testes com especificidade alta são indicados para confirmar um diagnóstico sugerido por testes prévios, já que raramente são positivos na ausência da doença (falso-positivos). Para calcular as medidas de sensibilidade e especificidade, os dados que dizem respeito aos indivíduos estudados e os resultados dos testes podem ser colocados em uma tabela 2 x 2 (Hatanaka & Benseñor, 2005; Leeflang *et al.*, 2008), como demonstrado no quadro abaixo (1.3).

**Quadro 1.3:** Possíveis interpretações para o resultado de um teste diagnóstico.

		Doença/ Teste referência	
		Ausente/ Negativo	Presente/ Positivo
Teste Índice*	Negativo	Verdadeiro-negativo (a)	Falso-negativo (b)
	Positivo	Falso-positivo (c)	Verdadeiro-positivo (d)

\*Teste em avaliação de desempenho.

Portanto, a sensibilidade (S) é a proporção de verdadeiro-positivos entre todos os doentes ( $S = d / (b + d)$ ); e especificidade (E) é a proporção de verdadeiro-negativos entre todos os sadios ( $E = a / (a + c)$ ). A acurácia (A) de um teste é definida como a porcentagem de vezes em que o teste acerta, ou seja, a proporção entre os verdadeiros positivos e negativos em relação a todos os resultados possíveis ( $A = (a + d) / (a + b + c + d)$ ) (Hatanaka & Benseñor, 2005).

Geralmente, o aumento de sensibilidade por meio da mudança no critério de positividade baseado em variável contínua, resulta na perda de especificidade; e o aumento da especificidade, por sua vez, gera queda da sensibilidade. A relação entre sensibilidade e especificidade pode ser apresentada graficamente por meio da curva ROC (do inglês *receiver-operating characteristic*). Através desta curva é possível determinar o melhor ponto de corte (*cut-off point*) para um teste diagnóstico; isto é, aquele que fornece, ao mesmo tempo, a melhor sensibilidade e a melhor especificidade. Na curva ROC, testes de bom poder discriminatório concentram-se no canto superior esquerdo, no qual, à medida que a

sensibilidade aumenta (diminuição do ponto de corte), há pouca ou nenhuma perda na especificidade, até que níveis altos de sensibilidade sejam alcançados. A acurácia global de um teste, por sua vez, pode ser descrita como a área sob a curva ROC: quanto maior a área, melhor é o teste (Hatanaka & Benseñor, 2005).

A sensibilidade e especificidade são medidas importantes de um teste, sendo úteis por si só. No entanto, essas medidas não respondem a duas questões clínicas importantes: se o resultado do teste de um paciente é positivo, qual a probabilidade de ele ter a doença que está sendo testada? E se o resultado é negativo, qual a probabilidade do paciente não ter a doença? Essas questões podem ser respondidas através dos valores preditivos, que se dividem em: valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN). O VPP refere-se à probabilidade de o paciente ter a doença, já que o teste resultou positivo; e o VPN refere-se à probabilidade de o paciente não ter a doença, visto que o resultado do teste foi negativo. Diferentemente da sensibilidade e especificidade, as quais são próprias do teste, os valores preditivos dependem da prevalência – proporção de pessoas com a doença em estudo em uma população definida, em determinado ponto do tempo. Assim, podemos dizer que prevalência é a probabilidade prévia (pré-teste), ou seja, a probabilidade de ter a doença antes de se conhecer o resultado do teste (Jekel *et al.*, 1999; Hatanaka & Benseñor, 2005).

Portanto, VPP é a proporção de verdadeiros positivos entre todos os indivíduos com teste positivo ( $VPP = d / (c + d)$ ). VPN é a proporção de verdadeiros negativos entre todos os indivíduos com o teste negativo ( $VPN = a / (a + b)$ ). A prevalência (P) refere-se a todos os casos da doença existentes previamente à realização de um teste ( $P = (b + d) / (a + b + c + d)$ ) (Hatanaka & Benseñor, 2005) (ver quadro 1.3).

### 1.3 – Justificativa

O Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV), localizado em Bio-Manguinhos/Fundação Oswaldo Cruz, possui uma longa experiência na realização do PRNT (teste referência, aplicado em placas de 6 poços) e do *micro* PRNT (método executado na rotina do Laboratório em placas de 96 poços). Esta técnica é amplamente utilizada na avaliação da vacina 17DD fabricada em Bio-Manguinhos em ensaios clínicos realizados na FIOCRUZ (Galler *et al.*, 2001; Marchevsky *et al.*, 2003; Camacho *et al.*, 2004; Freire *et al.*, 2005; Marchevsky *et al.*, 2006; Camacho *et al.*, 2007). No entanto, o *micro* PRNT para febre amarela ainda não havia sido formalmente validado pelo Laboratório. Recentemente, por solicitação da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), fez-se uma validação deste método. Porém, para esta validação, somente o coeficiente de variação (uma medida simples

de dispersão relativa, a qual não responde às medidas de acurácia) referente aos resultados obtidos de cada operadora foi determinado (protocolo nº 4353). A avaliação completa do desempenho do *micro* PRNT<sub>50</sub>, utilizando as medidas ideais para determinação de confiabilidade e acurácia ainda não havia sido realizada. A própria experiência do Latev com este método por quase 20 anos indicava a necessidade de uma avaliação estruturada do desempenho do *micro* PRNT<sub>50</sub>, pois já se observava limitações na reprodutibilidade do teste (Camacho *et al.*, 2004).

Portanto, diante da ampla utilização e da necessidade de se avaliar o *micro* PRNT, o processo de validação deste método é da maior importância para os estudos clínicos de análise da resposta vacinal contra febre amarela no Brasil. Assim, este estudo tem por finalidade determinar a confiabilidade e a acurácia do *micro* PRNT para febre amarela tomando como referência o PRNT em placas de 6 poços.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 – Geral

O presente estudo visa avaliar a confiabilidade e a acurácia do *micro* PRNT utilizado para a determinação do título de anticorpos neutralizantes presentes no soro de um grupo de indivíduos brasileiros imunizados com a vacina 17DD produzida em Bio-Manguinhos.

### 2.2 – Específicos

- Determinar a repetibilidade do *micro* PRNT a partir de 3 ensaios independentes deste método para cada soro, pelo mesmo operador;
- Determinar a reprodutibilidade do *micro* PRNT através da realização deste método por 3 diferentes operadores;
- Avaliar os parâmetros de acurácia do *micro* PRNT através da comparação dos resultados deste método com os resultados do teste referência (PRNT);
- Determinar o melhor ponto de corte do teste utilizando a curva ROC;
- Comparar a sensibilidade e a especificidade do *micro* PRNT baseado no percentual de redução da infecciosidade viral total de 50% (*micro* PRNT<sub>50</sub>) com o *micro* PRNT baseado no percentual de redução de 90% (*micro* PRNT<sub>90</sub>).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 – Soros Amostrais

Foram utilizados 200 soros de adultos do sexo masculino que participaram de um estudo de dose-resposta da vacina contra FA produzida em Bio-Manguinhos (vírus vivo atenuado da cepa 17DD). Os soros foram previamente inativados a 56°C em banho-maria por 30 minutos e mantidos a - 20°C até a realização dos testes.

A utilização dos soros para a realização do estudo dose-resposta foi aprovada pela Comissão de Ética do IPEC (Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas) pelo Parecer nº 058/2008, de 10 de novembro de 2008 (protocolo do projeto: CAAE 0038.0.009.000-08). A utilização dos soros selecionados para o presente estudo foi autorizada pelo coordenador do estudo dose-resposta Dr. Reinaldo de Menezes Martins.

#### 3.2 – Soro Padrão *In House*

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

#### 3.3 – Vírus

O vírus desafio utilizado foi o lote semente secundário 17D/WHO 213/77/BR - 1B/86. No momento do uso, uma alíquota viral foi reconstituída com 1mL de água destilada estéril e esta permaneceu em repouso por, pelo menos, 10 minutos para a completa reconstituição do líofilo. Após esse período, a alíquota foi vigorosamente homogeneizada (para dissolver completamente a pastilha) e, em seguida, diluída (em meio diluente para PRNT) de forma a obter uma média de 30 placas de lise por orifício (número determinado para melhorar a visualização do resultado).

#### 3.4 – Soluções e Reagentes

Bicarbonato de sódio 4,4% gaseificado (NaHCO<sub>3</sub>)

NaHCO <sub>3</sub>	44 g
Vermelho de fenol 1%	1 ml
Água bidestilada q.s.p.	1000 ml

Instruções: Adição de gelo seco com agitação até a solução atingir pH 7,0 – 7,2; alíquotar em 20 ml e esterilizar por autoclavação (121°C por 15 minutos).

Verseno – Solução estoque 5%

EDTA	50 g
Vermelho de fenol 1%	0,1 ml
Água destilada q.s.p.	1000 ml

Instruções: Misturar e acertar o pH para 7,6 com NaOH 1N. Estocar a temperatura ambiente.

Tripsina/verseno

Tripsina estoque	0,5 ml
Verseno	50 ml

Instruções: Preparar imediatamente antes do uso.

Soro Fetal Bovino (Cultilab)

Inativado a 56°C por 30 minutos. Aliquotado (50 ml) e armazenado à 4°C.

Sulfato de gentamicina (Garamicina)

1 ampola de Garamicina (2 ml) para 18 ml de água bidestilada estéril.

Carboximetilcelulose (CMC) 3%

CMC	3 g
Água bidestilada q.s.p.	100 ml

Instruções: homogeneização por agitação vigorosa (liquidificador); autoclavação (121°C por 20 minutos); armazenagem a temperatura ambiente.

Meio 199 com sais de Earle completo (meio diluente para o *micro* PRNT e o PRNT)

	Sistema Fechado (garrafas de cultura)	<i>Micro</i> PRNT	PRNT
Meio 199 com sais de Earle 10X*	10%	10%	10%
Hepes 1M	-	2,5%	-
NaHCO <sub>3</sub> 4,4% (pH 7,0)	2,5%	0,5%	5%
SFB inativado (Cutilab)	5%	5%	5%
Sulfato de gentamicina (4 mg/ml)	1%	1%	1%
Água destilada q.s.p.	100 ml	100 ml	100 ml

\*Diluído em água destilada estéril, completando o volume total necessário.

Instruções: Todo o material estéril, preparo no momento do uso.

CMC (Carboximetilcelulose)

Meio 199 com sais de Earle 10X*	10%
NaHCO <sub>3</sub> 4,4% (pH 7,0)	5%
SFB inativado	5%
Sulfato de gentamicina (4 mg/ml)	1%
Fungizona (500mg/ml)	0,4%
CMC 3% (Sigma) q.s.p.	100 ml

\*Diluído no CMC 3%, completando o volume total necessário.

\*\*Previamente preparado e esterilizado.

Instruções: Todo material estéril; preparo no momento do uso. Homogeneizar vigorosamente.

Formaldeído 10%

Formaldeído 37%	1000 ml
Água destilada	2600 ml

Instruções: Preparar e estocar a temperatura ambiente.

Cristal Violeta – Solução Estoque (2%)

Cristal Violeta	10 g
Metanol	100 ml
Água destilada q.s.p.	500 ml

Cristal Violeta – Solução de Uso (0,04%)

Cristal Violeta solução estoque	20 ml
Água destilada q.s.p.	1000 ml

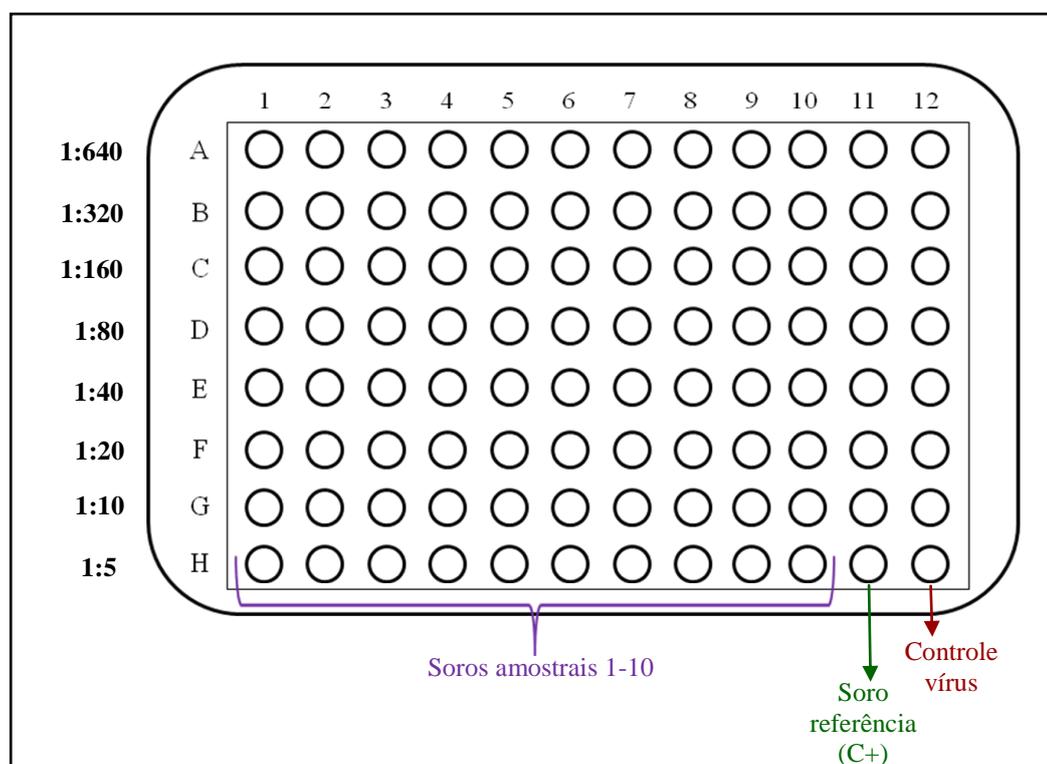
Instruções: Preparar e estocar a temperatura ambiente.

**3.5 – Células**

Células Vero, uma linhagem de rim de macaco verde africano (ATCC, CCL 81), expandidas a partir do banco de células (mantidas à -196°C em container de N<sub>2</sub>) foram mantidas em meio 199 com sais de Earle (10X), tamponado com bicarbonato de sódio gaseificado 4,4%, suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado e antibiótico (1% de garamicina/ 100mL). A concentração celular utilizada no *micro* PRNT foi de  $2,7 \times 10^5$ / cm<sup>2</sup>. Para o PRNT a concentração utilizada foi de  $1,0 \times 10^5$ / cm<sup>2</sup>, as quais foram semeadas em placas de 6 poços 24 horas antes do teste ser realizado (monocamadas pré-formadas).

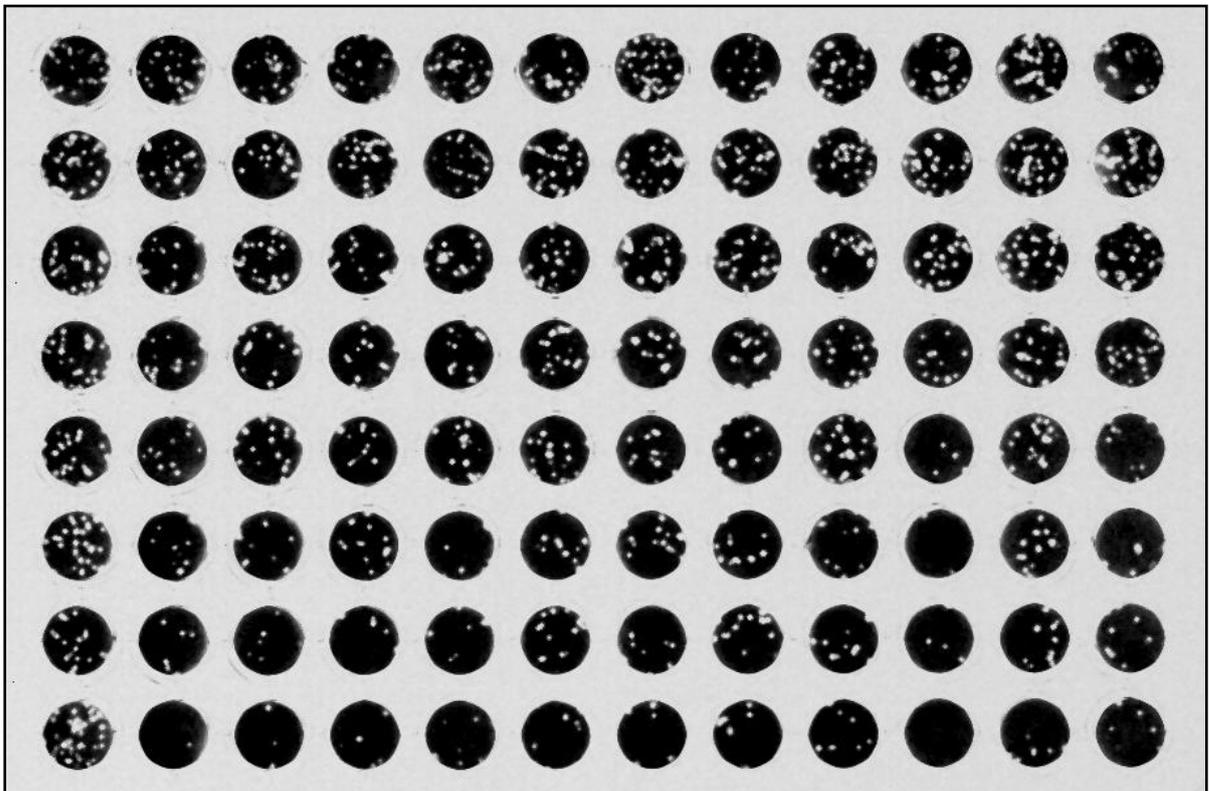
### 3.6 – Micro PRNT (placa de 96 poços)

Para cada teste, diluições seriadas das 200 amostras de soros em meio diluente para PRNT foram realizadas em placas de 96 poços (colunas 1 a 10 de cada placa, onde cada coluna recebeu uma amostra de soro distinta) de modo que tenhamos diluições de 1:5 a 1:640 (fator 2). A coluna 11 de cada placa foi destinada à mesma diluição seriada do soro padrão (controle positivo). Após esta etapa de diluições seriadas dos soros, 50µL do vírus da FA (na concentração necessária para a obtenção de uma média de 30 placas de lise por orifício, determinada previamente por titulação viral) foram distribuídos em todos os poços das placas. A coluna 12 de cada placa foi destinada ao controle de vírus; ou seja, somente o vírus diluído em meio diluente para PRNT (figura 3.1). Para a etapa de neutralização, os vírus e os soros foram incubados por 1 hora no escuro e em temperatura ambiente. Após essa incubação, 50µL de uma suspensão de células Vero ( $2,7 \times 10^5 / \text{cm}^2$ ) foram adicionados a cada orifício da placa e esta foi incubada novamente por 3 horas a 37°C em incubadora BOD (do inglês *Biochemical Oxygen Demand*). Nesta etapa, os vírus que não foram neutralizados se ligam às células, onde estas formam uma monocamada (etapa de adsorção). Após esse período, o sobrenadante foi completamente descartado e adicionou-se 100µl de CMC (meio semi-sólido) em todos os orifícios da placa. Finalmente, as monocamadas foram incubadas por 6 dias a 37°C em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> (Stefano *et al.*, 1999; Freire *et al.*, 2005).



**Figura 3.1:** Esquema ilustrativo da placa de 96 poços para a realização do *micro PRNT*. As colunas 1 a 10 foram destinadas aos soros amostrais e a coluna 11 ao soro referência. Estes soros foram submetidos às diluições seriadas de 1:5 a 1:640 (fator 2). A coluna 12 é destinada ao controle de vírus, o qual não sofre diluições seriadas. C+ = controle positivo (M7/100).

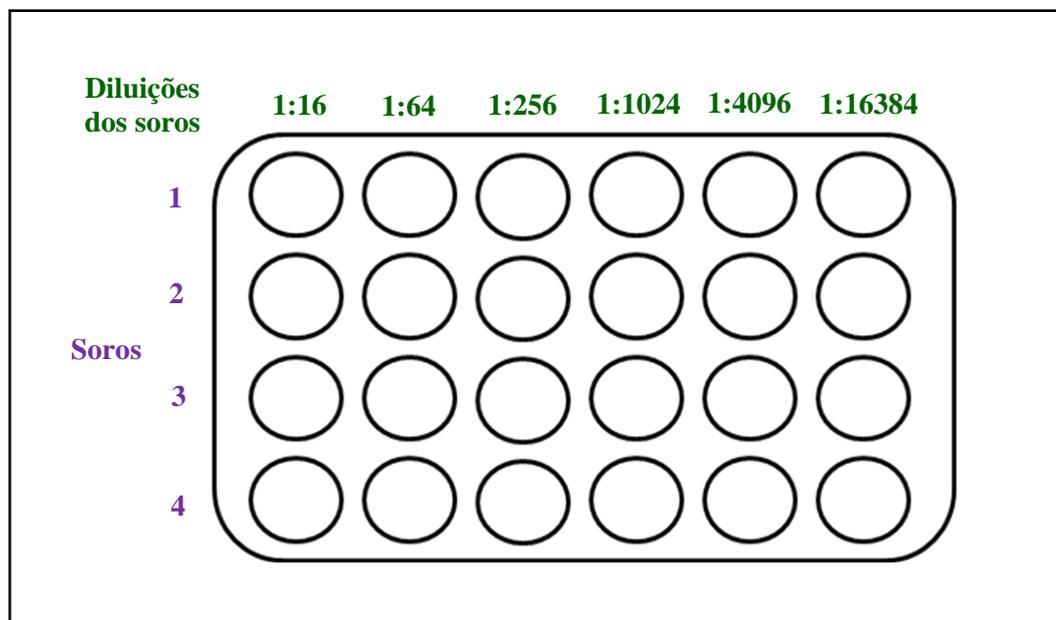
Após 6 dias, as monocamadas foram fixadas com 0,2mL de formol (10%) por, pelo menos, 1 hora a temperatura ambiente. O formol foi retirado por inversão vigorosa das placas, seguida de lavagem das monocamadas formadas em uma cuba com água corrente até a completa remoção do CMC. Em seguida, foram colocados 100µl do corante cristal violeta (0,04%) em todos os orifícios da placa, que permaneceu por 30 minutos em temperatura ambiente. Após fixadas, coradas e secas, as placas de lise formadas foram contadas (Stefano *et al.*, 1999; Freire *et al.*, 2005). A foto abaixo (figura 3.2) é representativa de uma microplaca submetida ao *micro* PRNT.



**Figura 3.2:** Foto de uma microplaca submetida ao *micro* PRNT (96 poços). Da esquerda para direita: coluna 1 – controle de vírus; coluna 2 – soro padrão *in house* (M7/100); demais colunas (3-12) – soros amostrais. Estes soros foram submetidos às diluições seriadas de 1:5 a 1:640 (fator 2).

### 3.7 – PRNT (placa de 6 poços)

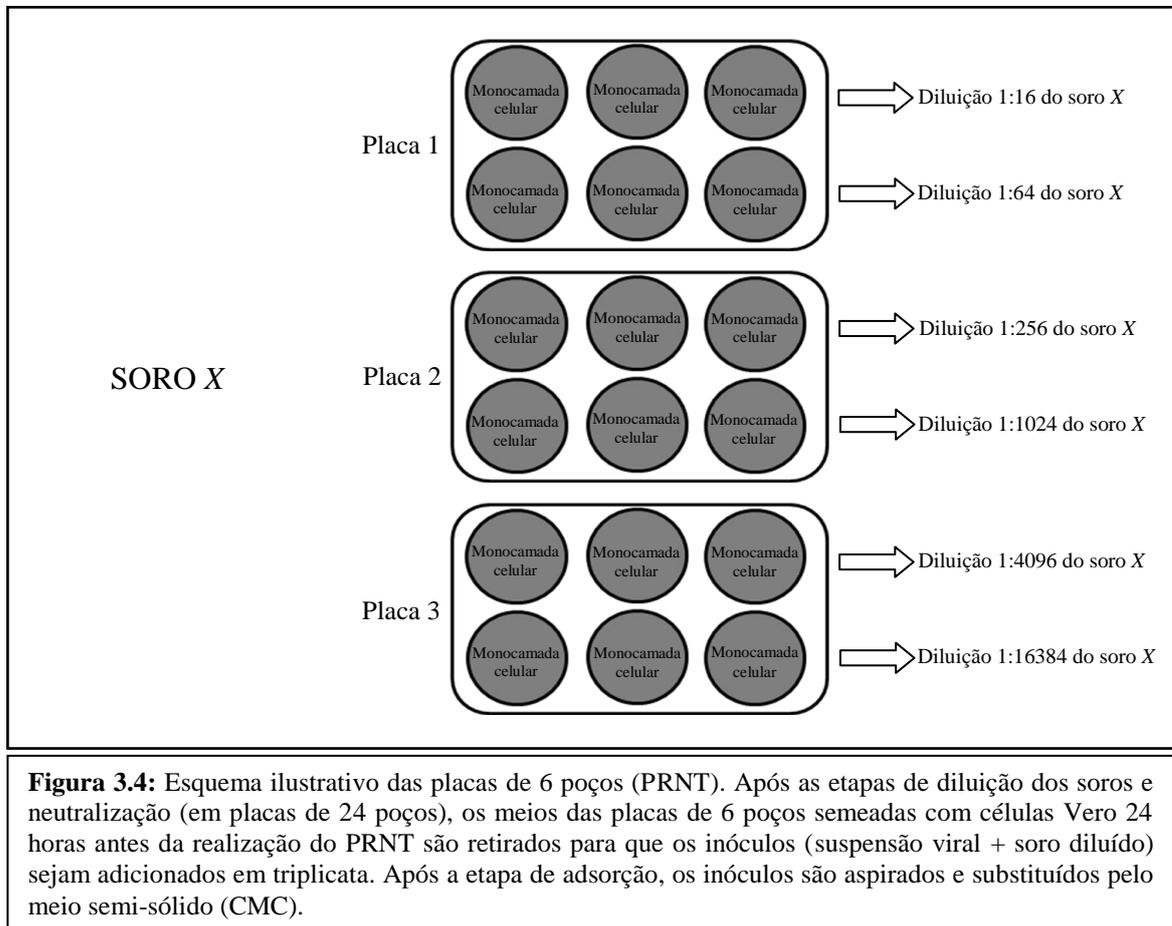
Diluições seriadas dos 200 soros (inclusive o soro padrão) em meio diluente para PRNT foram realizadas em placas de 24 poços, de modo a obter diluições de 1:16 a 1:16384 (fator 4) (figura 3.3). Após essa etapa, 500 $\mu$ L de cada diluição de soro foram misturadas com 500 $\mu$ L de suspensão viral em uma segunda placa de 24 poços (a reconstituição e a diluição do vírus foram realizadas previamente, de modo a obter 30-40 placas de lise por poço). O mesmo procedimento foi realizado para o controle de vírus: 800 $\mu$ L da suspensão viral foi misturada com 800 $\mu$ L de meio diluente (diluição 1:2). Para a etapa de neutralização, os vírus e os soros foram incubados por 1 hora em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.



**Figura 3.3:** Esquema ilustrativo da placa de 24 poços para a realização do PRNT em placas de 6 poços. Primeiramente, os soros são submetidos a diluições seriadas (1:16 a 1:16384 – fator 4), onde cada linha de poços destina-se às diluições de um soro. Após essa etapa, em uma segunda placa de 24 poços, todas as 6 diluições de cada soro são adicionadas com o vírus da FA. Para o controle de vírus, 0,8mL da suspensão viral foi misturada com 0,8mL de meio diluente em um orifício da placa de 24 poços.

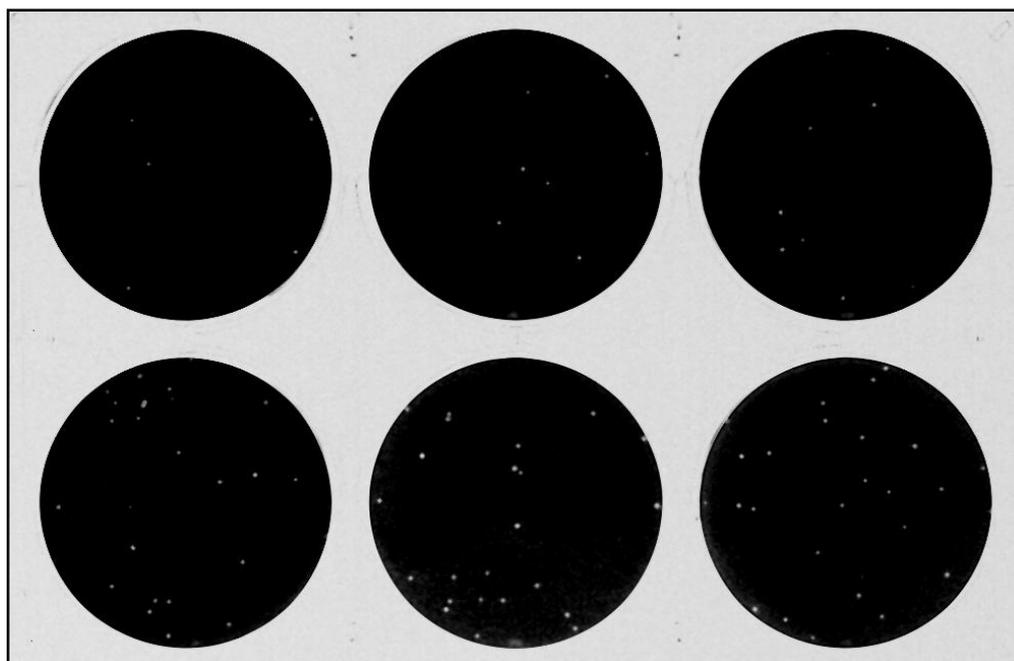
Após a etapa de neutralização, todo o meio das placas de 6 poços (semeadas 24 horas antes com células Vero) foi retirado e, em seguida, adicionou-se a cada poço 0,2mL das misturas vírus-soro descritas acima. As diluições de cada soro (total de 6) foram feitas em triplicata, totalizando, portanto, 3 placas (de 6 poços) por soro (figura 3.4); enquanto o controle de vírus foi em sextuplicata (1 placa completa). As monocamadas foram incubadas por 1 hora em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para que ocorresse a adsorção. Após essa incubação, as misturas foram aspiradas e, em cada poço, adicionou-se 3mL de

CMC. As monocamadas foram incubadas por 7 dias em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> (Marchevsky *et al.*, 2003; Freire *et al.*, 2005).



**Figura 3.4:** Esquema ilustrativo das placas de 6 poços (PRNT). Após as etapas de diluição dos soros e neutralização (em placas de 24 poços), os meios das placas de 6 poços semeadas com células Vero 24 horas antes da realização do PRNT são retirados para que os inóculos (suspensão viral + soro diluído) sejam adicionados em triplicata. Após a etapa de adsorção, os inóculos são aspirados e substituídos pelo meio semi-sólido (CMC).

Passados os 7 dias, as monocamadas foram fixadas por, pelo menos, 1 hora a temperatura ambiente com 3mL de formol (10%) em cada orifício, lavadas para a retirada completa do CMC e coradas por 30 minutos com 3mL de cristal violeta por orifício. Após a secagem das monocamadas a 37°C, as placas de lise formadas foram contadas (Marchevsky *et al.*, 2003; Freire *et al.*, 2005). Abaixo (figura 3.5) uma foto representativa de uma placa resultante do PRNT.



**Figura 3.5:** Foto de uma placa de 6 poços resultante do PRNT. Os três orifícios de cima são representativos de um soro na diluição 1:16. Os orifícios de baixo são representativos do mesmo soro na diluição 1:64.

### 3.8 – Cálculos do Título de Anticorpos

Primeiramente calcula-se o *end-point* do teste, que 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 *end-point* de 50% do teste foi determinado multiplicando-se a média aritmética do número de placas de lise obtidas no controle de vírus por 0,5. Para a determinação do *end-point* de 90%, a média aritmética do número de placas de lise obtidas no controle de vírus foi multiplicada por 0,1.

A diluição do soro amostral que reduziu o número de placas de lise em 50% ou em 90% foi calculada através de regressão linear utilizando o Microsoft Excel 2007 por interpolação das diluições correspondentes ao número de plaques imediatamente acima e abaixo do *end-point* determinado. A concentração de anticorpos em mUI/mL foi calculada com relação aos anticorpos presentes no soro referência internacional, da seguinte forma: o quociente da divisão de 1115 mUI/ml pela diluição correspondente ao *end-point* (de 50% ou 90%) da referência, multiplicado pela diluição do soro amostral equivalente ao *end-point* determinado para o teste. O *base line* foi calculado na menor diluição dos soros (1:5 para o *micro PRNT*), pois corresponde ao limite de detecção do teste.

### 3.9 – Titulação Viral

A experiência do Latev com o *micro* PRNT indica que para melhorar a sensibilidade do teste em placas com poços de 0,3 cm<sup>2</sup> de área, é preciso que o vírus desafio seja diluído de forma que se obtenha aproximadamente 30 placas de lise por orifício referente ao controle de vírus. Para saber a diluição viral necessária para tal é preciso fazer uma titulação do vírus desafio previamente à realização do teste de neutralização.

A quantificação do vírus vacinal utilizado no Latev (lote semente secundário 17D/WHO 213/77/BR - 1B/86) é feita com uma determinada frequência para a realização do *micro* PRNT. Porém, é observada uma variação frasco a frasco do lote vacinal, em que uma diluição viral pré-determinada não é suficiente para alcançar 30 placas de lise por orifício ou ultrapassa este número. Consequentemente o teste precisa ser repetido, levando à perda de material e insumos além de prejudicar a agilidade no lançamento de resultados de estudos clínicos realizados por Bio-Manguinhos e outras unidades da Fiocruz.

A variação na diluição viral ideal para a realização do *micro* PRNT motivou a realização de uma nova quantificação do vírus estoque, na qual 10 frascos do lote vacinal foram titulados em placas de 96 orifícios, de forma que cada placa foi destinada à titulação de um frasco. Foram feitas diluições seriadas do vírus (fator 2), começando de 1:1 até 1:2048 e aplicou-se o mesmo protocolo utilizado para a neutralização (ver tópico 3.6). Essa titulação foi repetida em dois outros dias, totalizando 30 frascos de vírus desafio submetidos à titulação. Calculou-se a média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação (ver tópico 3.10.4, a seguir) resultantes de cada coluna de poços correspondente a uma diluição em todas as 30 placas.

Foram observadas 18 placas em que a diluição de 1:1024 do vírus vacinal resultava em, aproximadamente, 30 placas de lise por orifício; e, portanto, a diluição viral de 1:1000 foi a escolhida para trabalhar neste estudo (dados não mostrados). A não obtenção de uma média do controle viral entre 20 e 40 placas de lise (*end-point* de 50% entre 10 e 20, respectivamente) foi utilizada como um critério de exclusão para o *micro* PRNT<sub>50</sub>. Testes com a média do controle de vírus fora destes limites foram desconsiderados e repetidos. Outro critério de exclusão foi a ultrapassagem do limite aceito para o coeficiente de variação (medida de avaliação do desvio-padrão com relação à média. Ver, a seguir, tópico 3.10.4) de 20% referente à média do controle viral.

As demais placas correspondentes à titulação apresentaram diluições de 1:512 e 1:2048 referentes a 30 placas de lise por orifício.

Para o PRNT (placas de 6 poços), a faixa aceita para o número de placas de lise por orifício é mais ampla por conta de uma área maior (9,62 cm<sup>2</sup>), o que facilita a visualização

dos plaques. A faixa aceita para o PRNT<sub>50</sub> é de 40 a 100 plaques por poço (*end-point* de 50% entre 20 e 50, respectivamente). Testes com a média do número de placas de lise para o controle de vírus fora desta faixa foram desconsiderados, assim como testes com coeficientes de variação referentes a estas médias acima de 20%. A diluição de 1:10.000 do vírus desafio para o PRNT já havia sido determinada pelo Latev por titulação em placas de 6 poços e foi utilizada com sucesso para a realização deste estudo.

### **3.10 – Análises Estatísticas**

O desempenho do *micro* PRNT para a determinação do título de anticorpos neutralizantes contra o vírus da FA foi aferido em termos de confiabilidade e acurácia.

Os resultados obtidos no PRNT e *micro* PRNT foram organizados no *Microsoft Excel 2007* e as análises estatísticas foram realizadas no *Statistical Package for Social Science V.17.0* (SPSS Institute Inc., 1990).

#### ***3.10.1 – Cálculo do tamanho da amostra***

O cálculo do tamanho da amostra foi feito previamente no programa WinPepi (Abramson, 2004). A utilização de 200 soros para este estudo foi calculada com base nos seguintes parâmetros: coeficiente de correlação intraclasse igual ou maior a 0,8, com nível de significância de 5% e amplitude do intervalo de confiança de 0,1. E para um Kappa esperado de 0,65 ou mais, considerando a frequência de soropositivos de 50%, com nível de significância de 5% e amplitude do intervalo de confiança de 0,2.

#### ***3.10.2 – Seleção dos soros***

A seleção das 200 amostras (de um universo de 900) foi feita de forma sistemática, onde os soros foram ordenados segundo títulos de anticorpos obtidos previamente no *micro* PRNT realizado para o estudo clínico (dose-resposta), de modo a representar um amplo espectro de resposta imune. A seleção destas amostras foi “cegada”, de forma que as operadoras participantes do presente estudo desconhecem os resultados (título de anticorpos) obtidos previamente.

#### ***3.10.3 – Operadoras***

Três operadoras participaram deste estudo: Ana Carolina dos Reis Cajaraville, Emily Hime Miranda e Marisol Simões. Todas são funcionárias do LATEV e foram previamente treinadas para a execução do PRNT em placas de 6 e de 96 poços.

Para a realização do *micro* PRNT fez-se um rodízio de operadoras organizadas em duplas, já que para a aplicação deste teste com 200 soros num mesmo dia é necessária a participação de duas operadoras. A operadora denominada “principal” realizou a maior parte do procedimento: adição do meio diluente, das suspensões viral e celular e do CMC em todas as placas, além de proceder a diluição do vírus, a diluição seriada dos soros e a contagem das placas de lise obtidas. A operadora denominada “auxiliar” foi responsável somente por colocar os soros amostrais nos poços das primeiras linhas de cada placa.

Denominou-se Dupla A aquela composta por Emily (operadora principal) e Marisol (operadora auxiliar); Dupla B Marisol (operadora principal) e Emily (operadora auxiliar); e Dupla C composta por Ana Carolina (operadora principal) e Marisol (operadora auxiliar).

#### **3.10.4 – Médias e Medidas de Dispersão**

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

Calculou-se as médias, os desvios-padrão e os coeficientes de variação dos nove resultados para cada um dos 200 soros – resultantes de três repetições realizadas por cada uma das três duplas (anexos 1 e 2). Essa avaliação foi importante para determinar que os resultados deste estudo seriam expressos em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL e não em  $\text{Log}_{10}$  X (correspondente à recíproca da diluição). Aquela forma resultou em um melhor cenário, com somente 20 soros apresentando um CV maior que 20%. Por outro lado, resultados expressos em  $\text{Log}_{10}$  da recíproca da diluição, 106 soros apresentaram CV acima de 20%.

O CV também foi utilizado para avaliar as médias obtidas das placas de lise contadas na triplicata de cada diluição dos soros e controles de vírus para o PRNT. Ensaios com o CV do controle de vírus maior do que 20% foram desconsiderados e repetidos.

#### **3.10.5 – Análises de confiabilidade**

Neste estudo, a repetibilidade foi avaliada a partir de três repetições independentes (sem conhecimento dos resultados anteriores) do *micro* PRNT para cada um dos 200 soros, realizadas por uma mesma dupla. Com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade do teste, as duas outras operadoras realizaram os mesmos procedimentos (quadro 3.1). As repetições foram realizadas sob as mesmas condições (de insumos, materiais, equipamentos, diluições do vírus e dos soros, incubações etc). A cada rotina (determinadas pelas diferentes datas) foi

realizado o *micro* PRNT para os 200 soros amostrais. A partir desses testes foi possível determinar o Coeficiente de Correlação Intraclasse (CCI) e o Coeficiente de Correlação de Pearson.

**Quadro 3.1:** Títulos de anticorpos (em mUI/mL) contra febre amarela segundo análises independentes do *micro* PRNT.

Soro	Dupla Operadora		
	A	B	C
S-1	<i>1a</i>	<i>1b</i>	<i>1c</i>
S-2	<i>2a</i>	<i>2b</i>	<i>2c</i>
S-3	<i>3a</i>	<i>3b</i>	<i>3c</i>
.....	.....	.....	.....
S- <i>n</i>	<i>na</i>	<i>Nb</i>	<i>nc</i>

Obs.: cenário hipotético para exemplo.

A concordância dos resultados quantitativos foi medida pelo CCI – utilizado para variáveis contínuas, é considerado ser a melhor medida para avaliar a concordância de resultados de diferentes operadores (Mcgraw & Wong, 1996) – com intervalos de confiança de 95%.

O Coeficiente de Correlação de Pearson também foi determinado como aproximação da repetibilidade e reprodutibilidade do *micro* PRNT. A correlação linear indica concordância entre duas séries de medidas quando a reta que descreve os pontos tem inclinação próxima de 45° e passa pela interseção dos eixos de X e Y. O instrumento de medida da correlação linear é dado pelo coeficiente de correlação de Pearson; uma medida do grau de relação linear entre duas variáveis quantitativas. Este coeficiente varia entre os valores -1 e 1. O valor 0 (zero) significa que não há relação linear, o valor 1 indica uma relação linear perfeita e o valor -1 também indica uma relação linear perfeita mas inversa, ou seja quando uma das variáveis aumenta a outra diminui. Quanto mais próximo estiver de 1 ou -1, mais forte é a associação linear entre as duas variáveis (Toledo & Ovalle, 1995b).

### 3.10.6 – Análises de acurácia

A acurácia foi aferida tomando como referência o PRNT em placas de 6 poços. Este é considerado o melhor método existente para dosagem de anticorpos neutralizantes para FA. Os parâmetros de acurácia utilizados neste estudo foram **sensibilidade** (probabilidade da amostra de soro ser reativa – “teste dar positivo” – nos indivíduos que têm anticorpos neutralizantes contra o vírus da FA) e **especificidade** (probabilidade da amostra de soro não ser reativa – “teste dar negativo” – nos indivíduos que não possuem anticorpos); além dos **valores preditivos positivo** (probabilidade do soro do indivíduo ter anticorpos contra o vírus dado que o teste mostrou ser reativo) e **negativo** (probabilidade do soro do indivíduo não apresentar anticorpos dado que o resultado do teste foi não-reativo), com intervalos de confiança de 95%.

A construção da curva ROC (*receiver-operating characteristic*) permitiu determinar o melhor ponto de corte (*cut-off point*) do teste; isto é, aquele que nos fornece, ao mesmo tempo, a melhor sensibilidade e a melhor especificidade para o *micro* PRNT<sub>50</sub> (Greiner *et al.*, 2000).

## 4. RESULTADOS

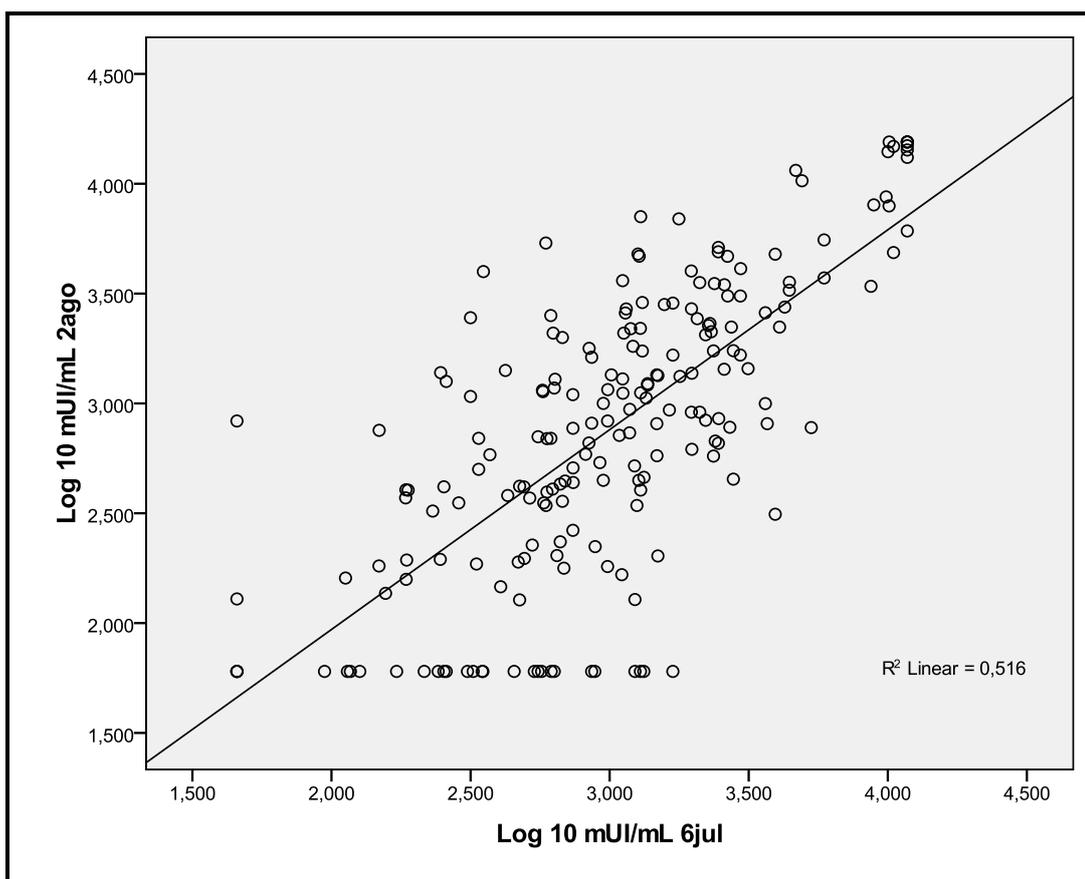
### 4.1 – Análises de Confiabilidade do *Micro PRNT*<sub>50</sub>

#### 4.1.1 – Repetibilidade

Na análise de repetibilidade da dupla A obteve-se um CCI de 0,64 (quadro 4.1) e os coeficientes de correlação de Pearson ficaram entre 0,67 e 0,72 (figura 4.1 e quadro 4.2). O CCI da dupla B foi de 0,62 (quadro 4.1) e os coeficientes de correlação de Pearson ficaram entre 0,62 e 0,71 (figura 4.2 e quadro 4.3). A dupla C apresentou um CCI de 0,76 (quadro 4.1) e coeficientes de correlação de Pearson que variaram de 0,77 a 0,78 (figura 4.3 e quadro 4.4).

**Quadro 4.1:** Análise de repetibilidade das duplas operadoras (considerando o EP50) analisada pelos Coeficientes de Correlação Intraclasse (CCI) obtidos a partir de três repetições independentes dos 200 soros submetidos ao *micro PRNT* por cada dupla. IC<sub>95%</sub> = Intervalo de confiança de 95%.

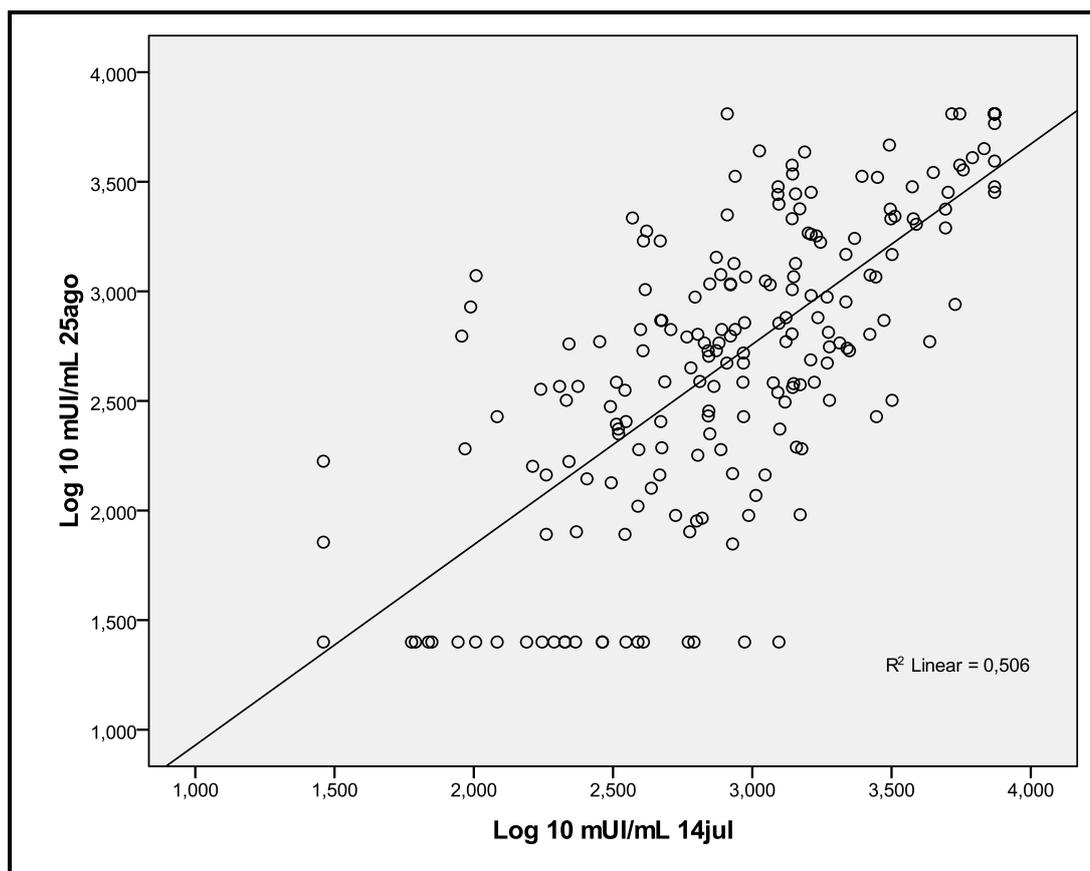
Dupla	CCI (IC <sub>95%</sub> )	CCI da Média (IC <sub>95%</sub> )
A	<b>0,64</b> (0,53-0,73)	0,84 (0,77-0,89)
B	<b>0,62</b> (0,50-0,70)	0,83 (0,75-0,88)
C	<b>0,76</b> (0,70-0,81)	0,90 (0,88-0,93)



**Figura 4.1:** Gráfico de dispersão obtido no SPSS V.17.0 representativo das análises de repetibilidade da dupla A (EP50). No eixo X, os resultados (em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL) dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT no dia 06/07/2010. No eixo Y os resultados (em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL) dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT no dia 02/08/2010. O coeficiente de correlação linear de Pearson desta análise foi de 0,72.

**Quadro 4.2:** Coeficientes de correlação de Pearson dos resultados obtidos dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT pela dupla A (EP50).

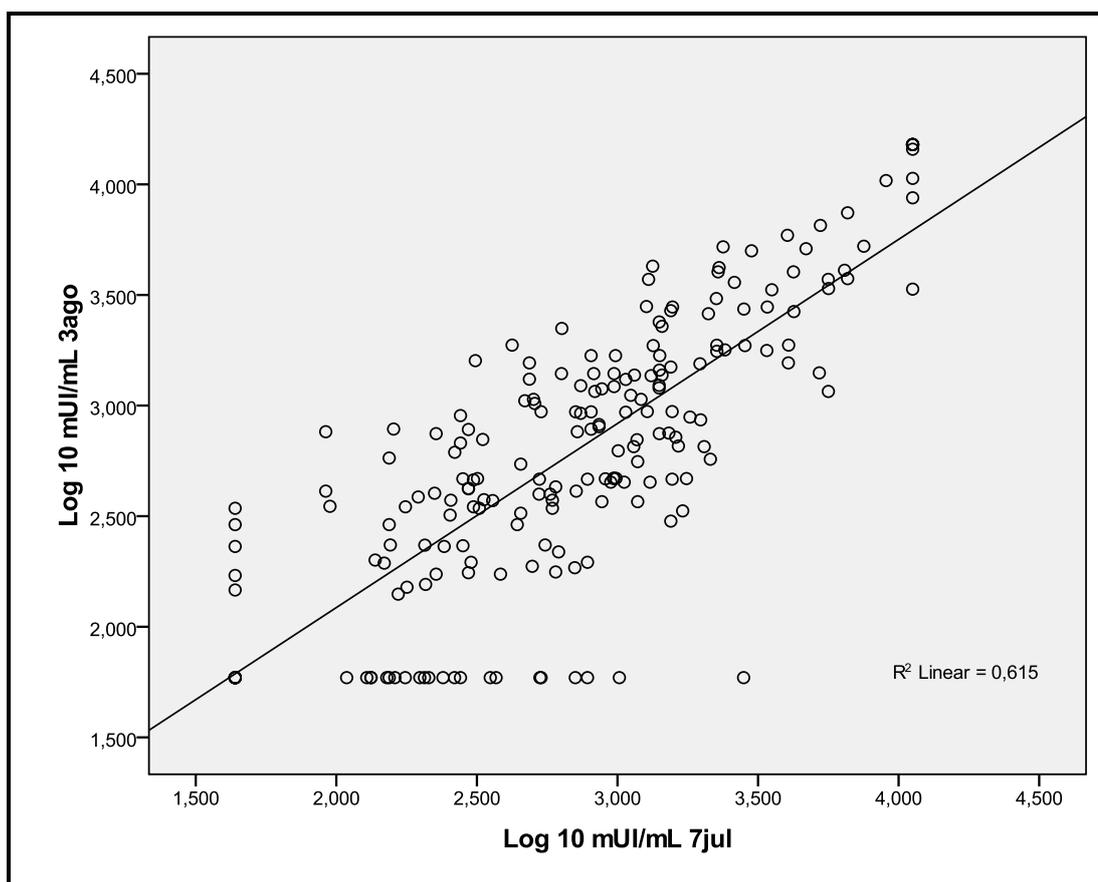
Variável Preditora (eixo X)	Variável Dependente (eixo Y)	Coefficiente de Correlação de Pearson
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 6 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 15 julho 2010	<b>0,67</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 6 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 2 agosto 2010	<b>0,72</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 15 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 6 julho 2010	<b>0,67</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 15 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 2 agosto 2010	<b>0,68</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 2 agosto 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 6 julho 2010	<b>0,72</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 2 agosto 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 15 julho 2010	<b>0,68</b>



**Figura 4.2:** Gráfico de dispersão obtido no SPSS V.17.0 representativo das análises de repetibilidade da dupla B (EP50). No eixo X, os resultados (em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL) dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT no dia 14/07/2010. No eixo Y os resultados (em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL) dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT no dia 25/08/2010. O coeficiente de correlação linear de Pearson desta análise foi de 0,71.

**Quadro 4.3:** Coeficientes de correlação de Pearson dos resultados obtidos dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT pela dupla B (EP50).

Variável Preditora (eixo X)	Variável Dependente (eixo Y)	Coefficiente de Correlação de Pearson
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 8 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 14 julho 2010	<b>0,69</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 8 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 25 agosto 2010	<b>0,62</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 14 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 8 julho 2010	<b>0,69</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 14 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 25 agosto 2010	<b>0,71</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 25 agosto 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 8 julho 2010	<b>0,62</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 25 agosto 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 14 julho 2010	<b>0,71</b>



**Figura 4.3:** Gráfico de dispersão obtido no SPSS V.17.0 representativo das análises de repetibilidade da dupla C (EP50). No eixo X, os resultados (em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL) dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT no dia 07/07/2010. No eixo Y os resultados (em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL) dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT no dia 03/08/2010. O coeficiente de correlação linear de Pearson desta análise foi de 0,78.

**Quadro 4.4:** Coeficientes de correlação de Pearson dos resultados obtidos dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT pela dupla C (EP50).

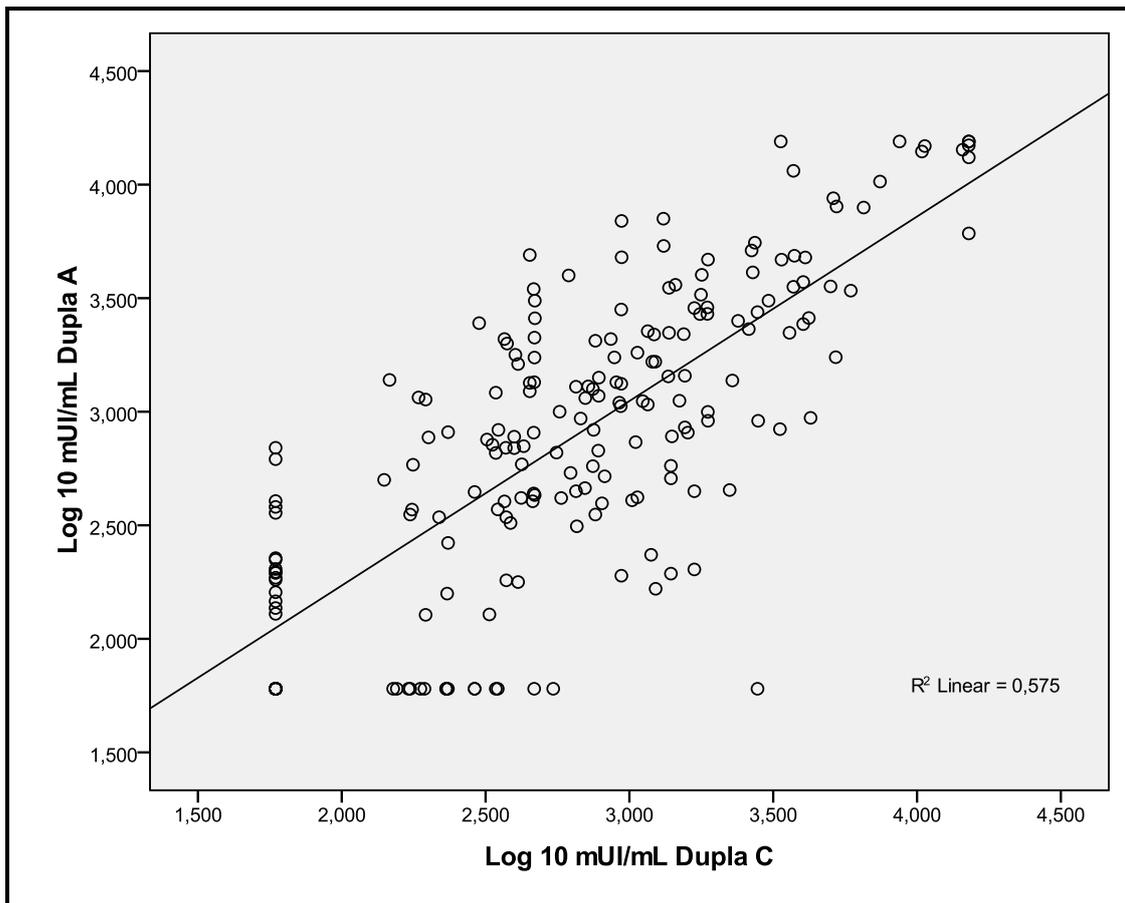
Variável Preditora (eixo X)	Variável Dependente (eixo Y)	Coefficiente de Correlação de Pearson
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 7 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 13 julho 2010	<b>0,77</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 7 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 3 agosto 2010	<b>0,78</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 13 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 7 julho 2010	<b>0,77</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 13 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 3 agosto 2010	<b>0,77</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 3 agosto 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 7 julho 2010	<b>0,78</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 3 agosto 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 13 julho 2010	<b>0,77</b>

#### 4.1.2 – *Reprodutibilidade*

Para a análise de reprodutibilidade considerou-se a 3ª rotina de cada dupla para determinar o nível de concordância entre elas. O CCI entre as três duplas foi de 0,72 (IC<sub>95%</sub>: 0,66-0,78) (quadro 4.5). O menor coeficiente de correlação de Pearson obtido foi 0,70 e o maior 0,76 (figura 4.4 e quadro 4.6).

**Quadro 4.5:** Coeficiente de Correlação Intraclasse (CCI) resultante da análise de reprodutibilidade do *micro* PRNT, considerando a 3ª rotina de cada dupla (EP50). IC<sub>95%</sub> = Intervalo de confiança de 95%.

Reprodutibilidade do	CCI (IC <sub>95%</sub> )	CCI da Média (IC <sub>95%</sub> )
<i>micro</i> PRNT	0,72 (0,66-0,78)	0,89 (0,85-0,91)



**Figura 4.4:** Gráfico de dispersão obtido no SPSS V.17.0 representativo das análises de reprodutibilidade das duplas operadoras (EP50). No eixo X, os resultados (em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL) dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT da Dupla C (3ª rotina). No eixo Y os resultados (em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL) dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT da dupla A (3ª rotina). O coeficiente de correlação linear de Pearson desta análise foi de 0,76.

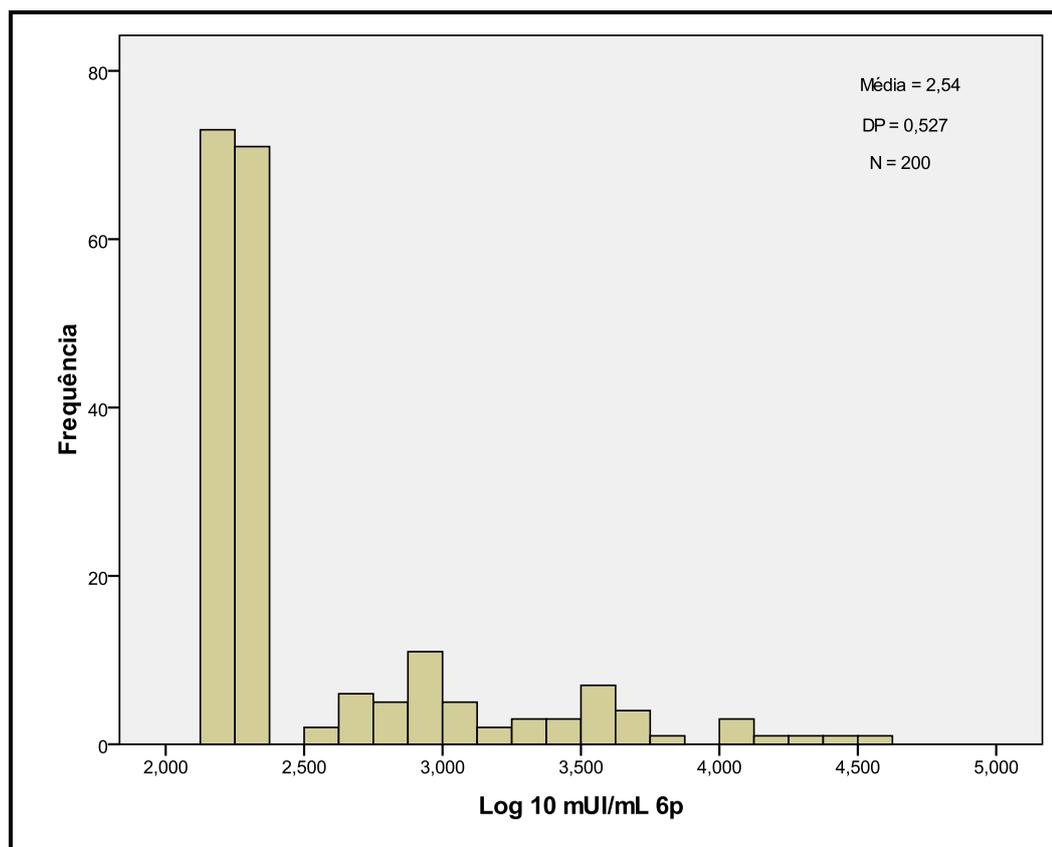
**Quadro 4.6:** Coeficientes de correlação de Pearson resultantes da análise de correlação do *micro* PRNT realizado pelas três duplas operadoras (considerando a 3ª rotina de cada dupla. EP50).

Variável Preditora (eixo X)	Variável Dependente (eixo Y)	Coefficiente de Correlação de Pearson
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla A	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla B	<b>0,70</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla A	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla C	<b>0,76</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla B	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla A	<b>0,70</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla B	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla C	<b>0,76</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla C	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla A	<b>0,76</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla C	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla B	<b>0,76</b>

## 4.2 – Análises de Acurácia do *Micro PRNT*<sub>50</sub>

### 4.2.1 – Determinação do ponto de corte para o *PRNT*<sub>50</sub>

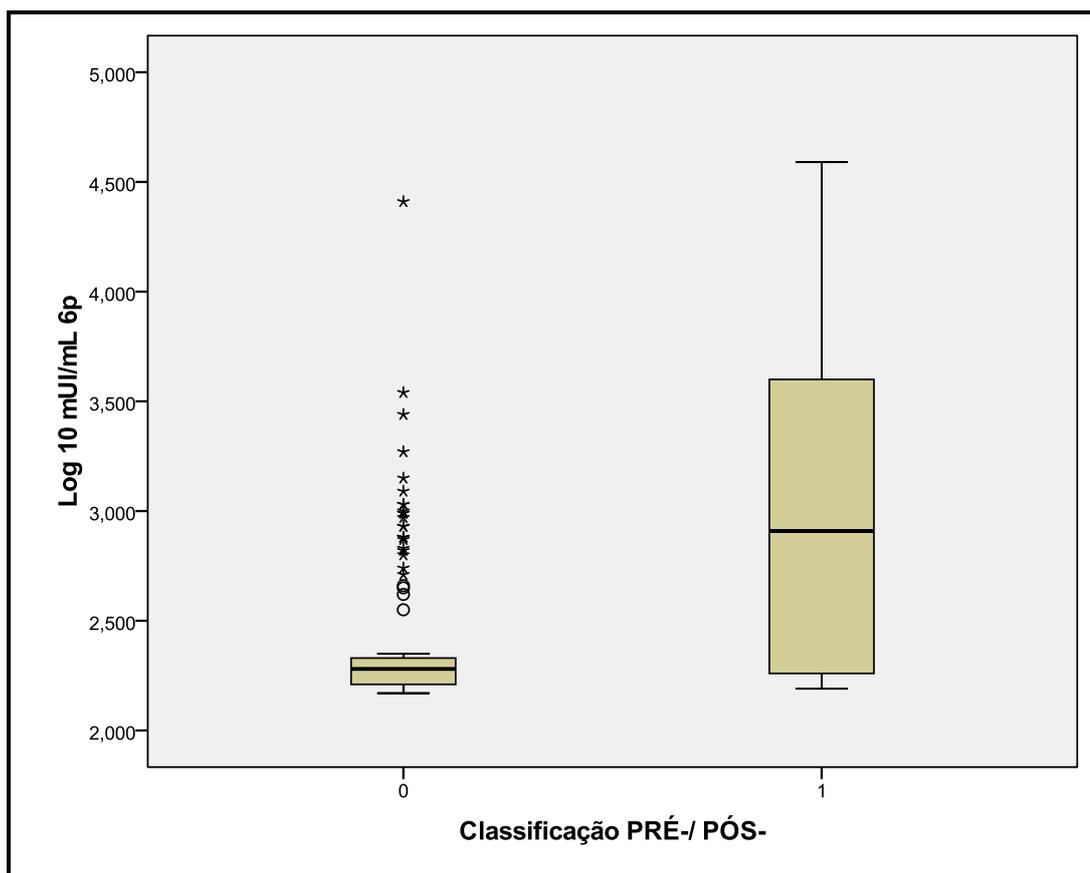
Para realizar as análises de acurácia do *micro PRNT* (placas de 96 poços) tomando como referência o *PRNT* (placas de 6 poços) foi preciso, primeiramente, determinar o ponto de corte para este último. Com esta finalidade, foi feito no SPSS um histograma de frequência considerando os resultados dos 200 soros submetidos ao *PRNT* (figura 4.5).



**Figura 4.5:** Histograma correspondente aos resultados (expressos em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL) obtidos dos 200 soros submetidos ao *PRNT* em placas de 6 poços, considerando o EP50. DP = Desvio-padrão.

Listando no Excel todos esses resultados obtidos constatou-se que 144 soros apresentaram resultados menores do que 2,5  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL; o que pode ser visualizado no histograma acima. Há uma separação bem definida de soros com resultados menores ou maiores que 2,5  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL.

Esses resultados indicam que o *PRNT* em placas de 6 poços possui uma forte relação com o estado imune esperado pela origem do soro (figura 4.6).



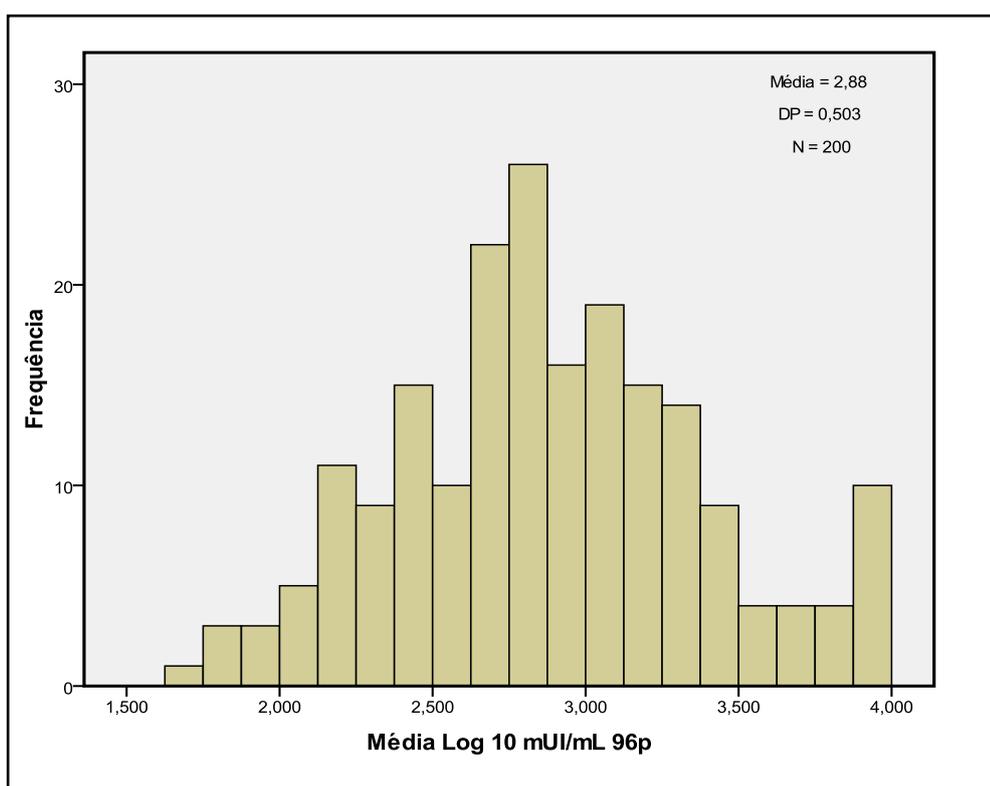
**Figura 4.6:** Boxplot dos 200 soros amostrais comparando a sua classificação com os seus resultados em placas de 6 poços. Eixo X: soros classificados como pré-vacinais (0) ou pós-vacinais (1). Eixo Y: resultados (expressos em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL) obtidos dos 200 soros submetidos ao PRNT, considerando o EP50.

Este boxplot permite visualizar que a grande maioria dos soros pré-vacinais (0) apresentaram resultados entre 2 e 2,5  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL para a concentração de anticorpos neutralizantes e alguns poucos soros (marcados como asteriscos no gráfico) apresentaram resultados maiores do que 2,5  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL. Os soros pós-vacinais (1) apresentaram resultados variados, entre, aproximadamente, 2 e 4,5  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL, com uma média em torno de 3  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL.

Portanto, a partir destas análises, determinou-se que o ponto de corte para o PRNT<sub>50</sub> em placas de 6 poços seria de 2,5  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL.

#### 4.2.2 – Análise dos parâmetros de acurácia do *micro PRNT*<sub>50</sub>

Previamente à realização deste estudo foi estabelecido pelo Latev que soros, submetidos ao *micro PRNT*<sub>50</sub>, com resultados acima de 631 mUI/mL (ou  $\geq 2,8 \text{ Log}_{10}$  mUI/mL) são considerados positivos para a presença de anticorpos neutralizantes contra febre amarela. Diferente do que ocorre para o *PRNT*<sub>50</sub> em placas de 6 poços, quando analisou-se um histograma de frequência considerando os resultados dos 200 soros no *micro PRNT*<sub>50</sub> (figura 4.7) não foi possível observar uma separação bem definida de soros negativos e positivos para a presença desses anticorpos. A média de todos os resultados dos 200 soros foi de 2,88.



**Figura 4.7:** Histograma correspondente às médias dos resultados (expressos em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL) obtidas a partir das 9 rotinas para cada um dos 200 soros submetidos ao *micro PRNT*, considerando o EP50. DP = Desvio-padrão.

Com o objetivo de determinar os parâmetros de acurácia do *micro* PRNT<sub>50</sub> com diferentes possíveis pontos de corte e, assim, determinar o melhor dentre eles, foram feitas no SPSS tabelas a partir das médias obtidas dos 9 resultados dos 200 soros, comparando o *micro* PRNT<sub>50</sub> (teste índice) com o PRNT<sub>50</sub> (teste referência), considerando os seguintes pontos de corte para o *micro* PRNT<sub>50</sub>: 2,5 (quadro 4.7); 2,6 (quadro 4.8); 2,7 (quadro 4.9); 2,8 (quadro 4.10) e 2,9 (quadro 4.11). Para o PRNT<sub>50</sub> (em placas de 6 poços) considerou-se 2,5 Log<sub>10</sub> mUI/mL como ponto de corte em todas as análises.

**Quadro 4.7:** Parâmetros de acurácia do *micro* PRNT com ponto de corte de 2,5 Log<sub>10</sub> mUI/mL (316 mUI/mL). Considerando as médias dos 9 resultados obtidos de cada soro (EP50).

		PRNT (6 poços)		Total
		Ponto de corte $\geq 2,5 \text{ Log}_{10} \text{ mUI/mL}$		
		Negativo	Positivo	
<b>Micro PRNT (96 poços)</b>	Negativo	47 <b>32,6%</b>	0 0%	47 23,5%
	Positivo	97 67,4%	56 <b>100%</b>	153 76,5%
Total		144 100%	56 100%	200 100%

Considerando o ponto de corte do *micro* PRNT<sub>50</sub> de 2,5 Log<sub>10</sub> mUI/mL obteve-se uma sensibilidade de 100% (56 soros classificados como positivos em ambos os testes); especificidade de 32,6% (47 soros com concordância de resultados entre os testes) e acurácia global de 51,5%; isto é, a soma dos verdadeiros negativos (47 soros) com os verdadeiros positivos (56 soros) em relação a todos os possíveis resultados (200 soros).

**Quadro 4.8:** Parâmetros de acurácia do *micro* PRNT com ponto de corte de 2,6 Log<sub>10</sub> mUI/mL (398 mUI/mL). Considerando as médias dos 9 resultados obtidos de cada soro (EP50).

		PRNT (6 poços)		Total
		Ponto de corte $\geq 2,5$ Log <sub>10</sub> mUI/mL		
		Negativo	Positivo	
<b>Micro PRNT (96 poços)</b>	Negativo	54 37,5%	0 0%	54 27%
	Positivo	90 62,5%	56 100%	146 73%
Total		144 100%	56 100%	200 100%

Com o ponto de corte do *micro* PRNT<sub>50</sub> em 2,6 Log<sub>10</sub> mUI/mL a sensibilidade foi de 100%; especificidade de 37,5% e acurácia global de 55%.

**Quadro 4.9:** Parâmetros de acurácia do *micro* PRNT com ponto de corte de 2,7 Log<sub>10</sub> mUI/mL (501 mUI/mL). Considerando as médias dos 9 resultados obtidos de cada soro (EP50).

		PRNT (6 poços)		Total
		Ponto de corte $\geq 2,5$ Log <sub>10</sub> mUI/mL		
		Negativo	Positivo	
<b>Micro PRNT (96 poços)</b>	Negativo	74 51,4%	0 0%	74 37%
	Positivo	70 48,6%	56 100%	126 63%
Total		144 100%	56 100%	200 100%

Um ponto de corte de 2,7 Log<sub>10</sub> mUI/mL para o *micro* PRNT<sub>50</sub> resulta em uma sensibilidade de 100%; especificidade de 51,4% e acurácia global de 65%.

**Quadro 4.10:** Parâmetros de acurácia do *micro* PRNT com ponto de corte de 2,8 Log<sub>10</sub> mUI/mL (631 mUI/mL). Considerando as médias dos 9 resultados obtidos de cada soro (EP50).

		PRNT (6 poços)		Total
		Ponto de corte $\geq 2,5$ Log <sub>10</sub> mUI/mL		
		Negativo	Positivo	
<b>Micro PRNT (96 poços)</b>	Negativo	87 <b>60,4%</b>	3 5,4%	90 45%
	Positivo	57 39,6%	53 <b>94,6%</b>	110 55%
Total		144 100%	56 100%	200 100%

O ponto de corte de 2,8 Log<sub>10</sub> mUI/mL para o *micro* PRNT<sub>50</sub> resultou em uma sensibilidade de 94,6%; especificidade de 60,4% e acurácia global de 70%.

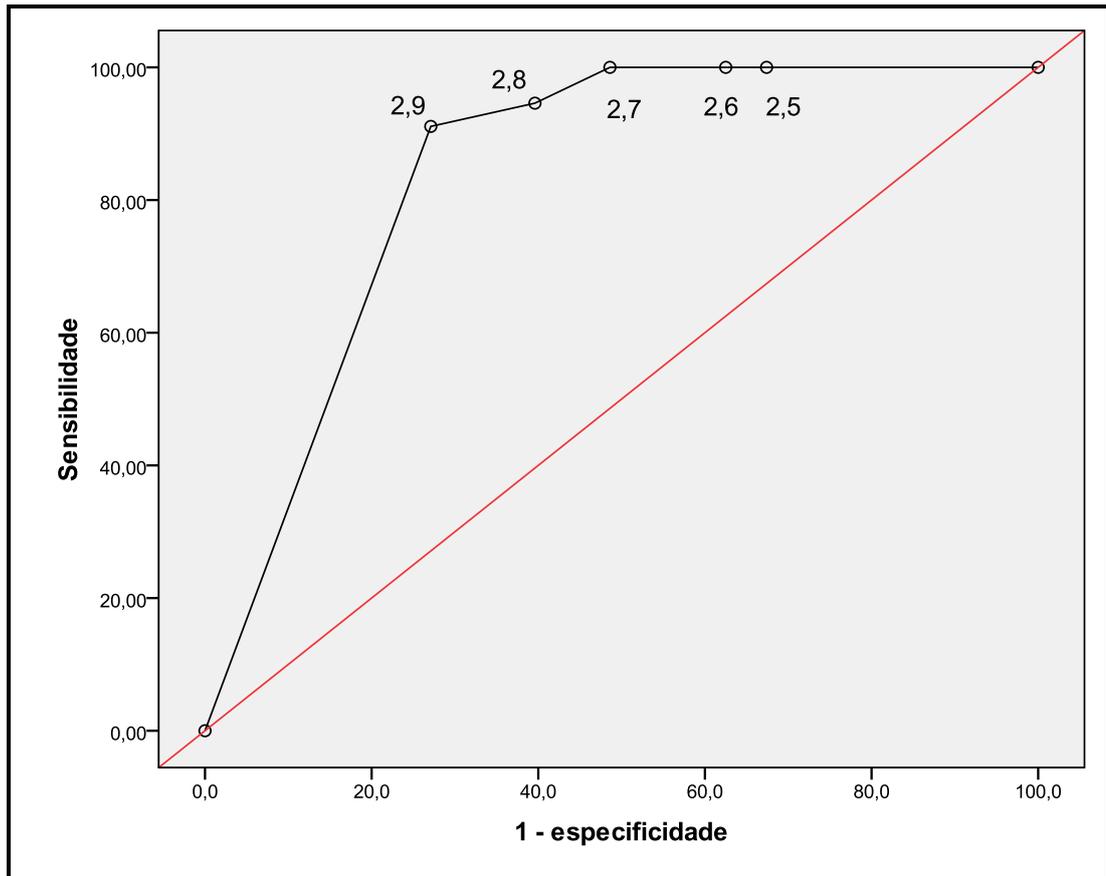
**Quadro 4.11:** Parâmetros de acurácia do *micro* PRNT com ponto de corte de 2,9 Log<sub>10</sub> mUI/mL (794 mUI/mL). Considerando as médias dos 9 resultados obtidos de cada soro (EP50).

		PRNT (6 poços)		Total
		Ponto de corte $\geq 2,5$ Log <sub>10</sub> mUI/mL		
		Negativo	Positivo	
<b>Micro PRNT (96 poços)</b>	Negativo	105 <b>72,9%</b>	5 8,9%	110 55%
	Positivo	39 27,1%	51 <b>91,1%</b>	90 45%
Total		144 100%	56 100%	200 100%

Considerando o ponto de corte para o *micro* PRNT<sub>50</sub> de 2,9 Log<sub>10</sub> mUI/mL obteve-se uma sensibilidade de 91,1%; especificidade de 72,9% e acurácia global de 78%.

### 4.2.3 – Curva ROC

A relação entre as sensibilidades e as especificidades obtidas do *micro* PRNT<sub>50</sub> com diferentes possíveis pontos de corte foi avaliada graficamente pela construção da curva ROC (figura 4.8).



**Figura 4.8:** Curva ROC com diferentes pontos de corte para o *micro* PRNT<sub>50</sub>. Eixo X: 1 – especificidade, correspondente a taxa de falsos positivos. Eixo Y: sensibilidade ou taxa de verdadeiros positivos.

A curva ROC mostrou que o valor limite de 2,9 Log<sub>10</sub> mUI/mL forneceu a melhor combinação de sensibilidade e especificidade para o teste: no canto superior esquerdo do gráfico e o mais distante da linha de referência, o que indica uma maior acurácia global.

#### 4.2.4 – Prevalência e valores preditivos

Considerando um cenário hipotético de surto de FA, por exemplo, pode-se calcular a prevalência da doença e os valores preditivos negativo e positivo. Para calcular essas medidas considerou-se os valores obtidos no PRNT<sub>50</sub> como casos e não-casos da doença; isto é, os 144 soros que resultaram negativo no PRNT<sub>50</sub> corresponderam à classificação da doença “ausente”, e os 56 soros positivos segundo o PRNT corresponderam à classificação da doença “presente” (ver quadro 4.11).

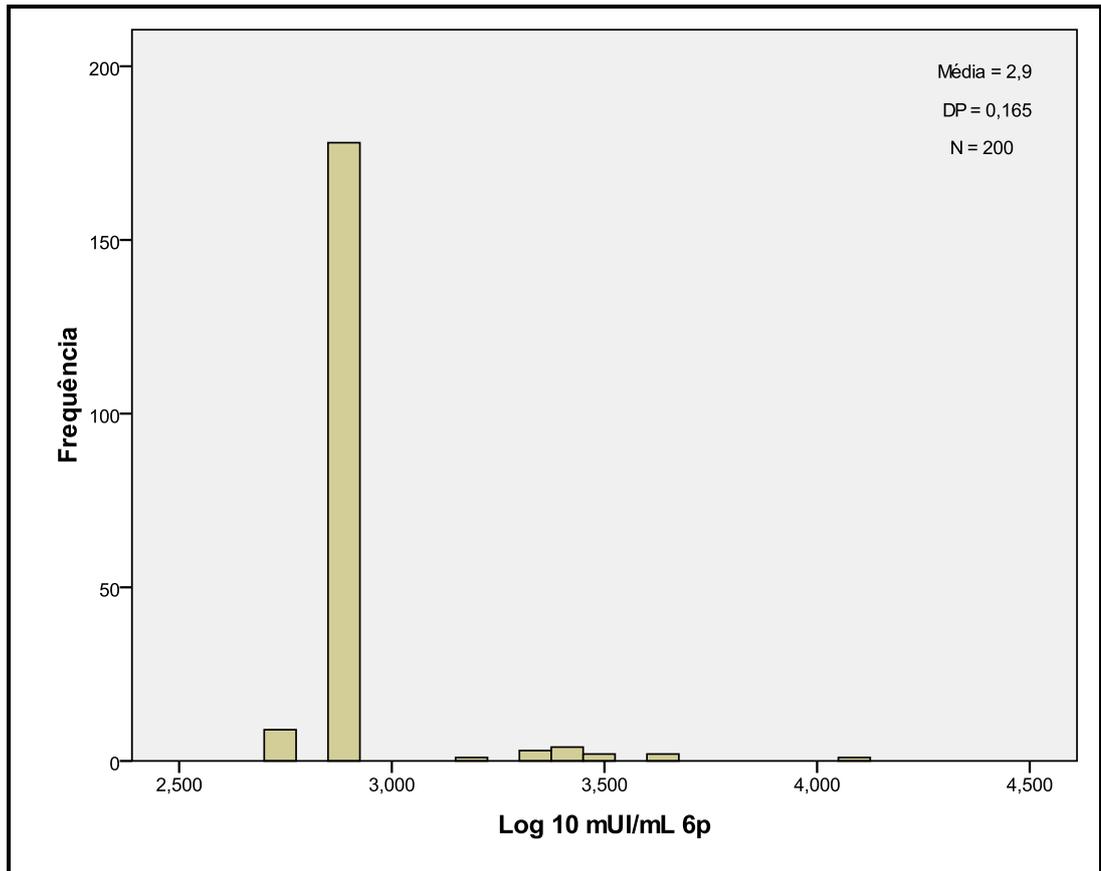
Assim, considerando os resultados obtidos do *micro* PRNT<sub>50</sub> com ponto de corte para a concentração de anticorpos neutralizantes para FA de 2,9 Log<sub>10</sub> mUI/mL (quadro 4.11), a prevalência da doença (se este cenário fosse real) foi de 28% (56 casos da doença em uma população amostral de 200 indivíduos), com valor preditivo negativo de 95,5% e positivo de 56,7%.

### 4.3 – Comparação dos Parâmetros de Acurácia Entre o *Micro* PRNT<sub>50</sub> e o *Micro* PRNT<sub>90</sub>

#### 4.3.1 – Determinação do ponto de corte para o PRNT<sub>90</sub>

Antes de comparar a acurácia do *micro* PRNT<sub>50</sub> com o *micro* PRNT<sub>90</sub> foi preciso determinar o ponto de corte para o PRNT<sub>90</sub>. A figura 4.9 é um histograma de frequência construído no SPSS, considerando os resultados dos 200 soros submetidos ao PRNT com *end-point* de 90%.

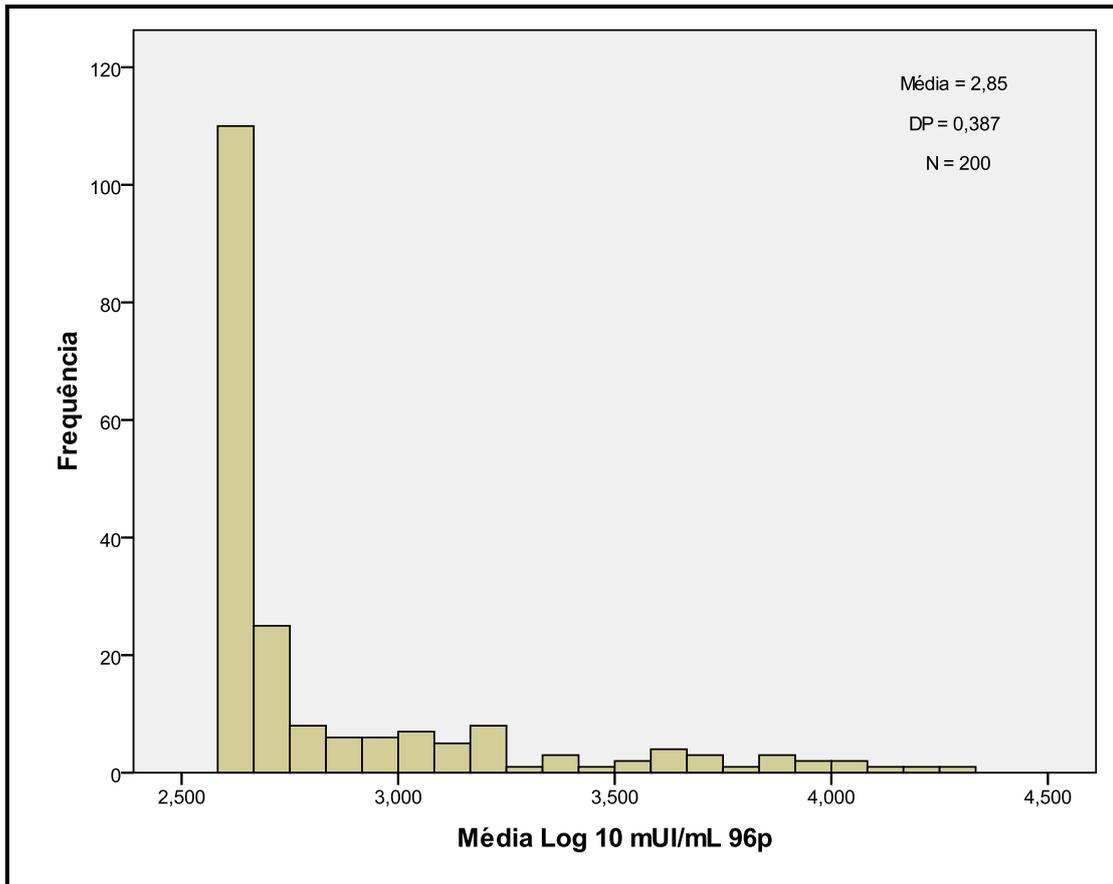
Neste histograma observa-se que a grande maioria dos soros apresenta resultados menores do que 2,9 Log<sub>10</sub> mUI/mL, mostrando uma separação bem definida dos soros com resultados maiores do que este valor. A listagem desses resultados no Excel em ordem crescente resulta em 187 soros com a concentração de anticorpos menor do que 2,9 Log<sub>10</sub> mUI/mL. Assim, considerou-se o ponto de corte para o PRNT<sub>90</sub> de 2,9 Log<sub>10</sub> mUI/mL.



**Figura 4.9:** Histograma correspondente aos resultados (expressos em Log<sub>10</sub> mUI/mL) obtidos dos 200 soros submetidos ao PRNT em placas de 6 poços, considerando o EP90. DP = Desvio-padrão.

#### 4.3.2 – Análise dos parâmetros de acurácia do *micro PRNT*<sub>90</sub>

O Latev não fornece seus resultados com base no *micro PRNT*<sub>90</sub>; portanto, não estabeleceu um ponto de corte para este. Foi construído no SPSS um histograma de frequência considerando as médias obtidas dos resultados dos 200 soros com base no EP90 (figura 4.10). Assim como para o *micro PRNT*<sub>50</sub>, a distribuição de frequência dos títulos de anticorpos neutralizantes contra FA não indica claramente os valores limites para definir soropositividade.



**Figura 4.10:** Histograma correspondente às médias dos resultados (expressos em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL) obtidas a partir das 9 rotinas para cada um dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT, considerando o EP90. DP = Desvio-padrão.

O critério que melhor discrimina o estado imune dos indivíduos foi definido estimando os parâmetros de acurácia (sensibilidade, especificidade e acurácia global) correspondente a diversos “pontos de corte” para o *micro* PRNT<sub>90</sub> (tomando o PRNT<sub>90</sub> em placas de 6 poços como referência) com a finalidade de definir o melhor entre eles (quadro 4.12).

**Quadro 4.12:** Parâmetros de acurácia do *micro* PRNT<sub>90</sub> com diferentes pontos de corte. Teste referência: PRNT<sub>90</sub> em placas de 6 poços.

	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia global
<i>Micro</i> PRNT <sub>90</sub> – Ponto de corte $\geq 2,9$ Log <sub>10</sub> mUI/mL (794 mUI/mL)	100%	79,1%	80,5%
<i>Micro</i> PRNT <sub>90</sub> – Ponto de corte $\geq 3,0$ Log <sub>10</sub> mUI/mL (1000 mUI/mL)	100%	82,9%	84%
<i>Micro</i> PRNT <sub>90</sub> – Ponto de corte $\geq 3,1$ Log <sub>10</sub> mUI/mL (1259 mUI/mL)	100%	86,6%	87,5%
<i>Micro</i> PRNT <sub>90</sub> – Ponto de corte $\geq 3,2$ Log <sub>10</sub> mUI/mL (1585 mUI/mL)	100%	90,9%	91,5%
<i>Micro</i> PRNT <sub>90</sub> – Ponto de corte $\geq 3,3$ Log <sub>10</sub> mUI/mL (1996 mUI/mL)	100%	93,6%	94%
<i>Micro</i> PRNT <sub>90</sub> – Ponto de corte $\geq 3,4$ Log <sub>10</sub> mUI/mL (2512 mUI/mL)	100%	94,7%	95%
<i>Micro</i> PRNT <sub>90</sub> – Ponto de corte $\geq 3,5$ Log <sub>10</sub> mUI/mL (3163 mUI/mL)	92,3%	95,7%	96%
<i>Micro</i> PRNT <sub>90</sub> – Ponto de corte $\geq 3,6$ Log <sub>10</sub> mUI/mL (3982 mUI/mL)	84,6%	96,8%	96%

O *micro* PRNT<sub>90</sub> com ponto de corte de 3,4 Log<sub>10</sub> mUI/mL apresentou as melhores medidas de acurácia, com sensibilidade de 100%, especificidade de 94,7% e acurácia global de 95%. Portanto, este ponto de corte foi escolhido para o *micro* PRNT<sub>90</sub>, o que possibilitou fazer a análise comparativa de acurácia deste método com o *micro* PRNT<sub>50</sub>.

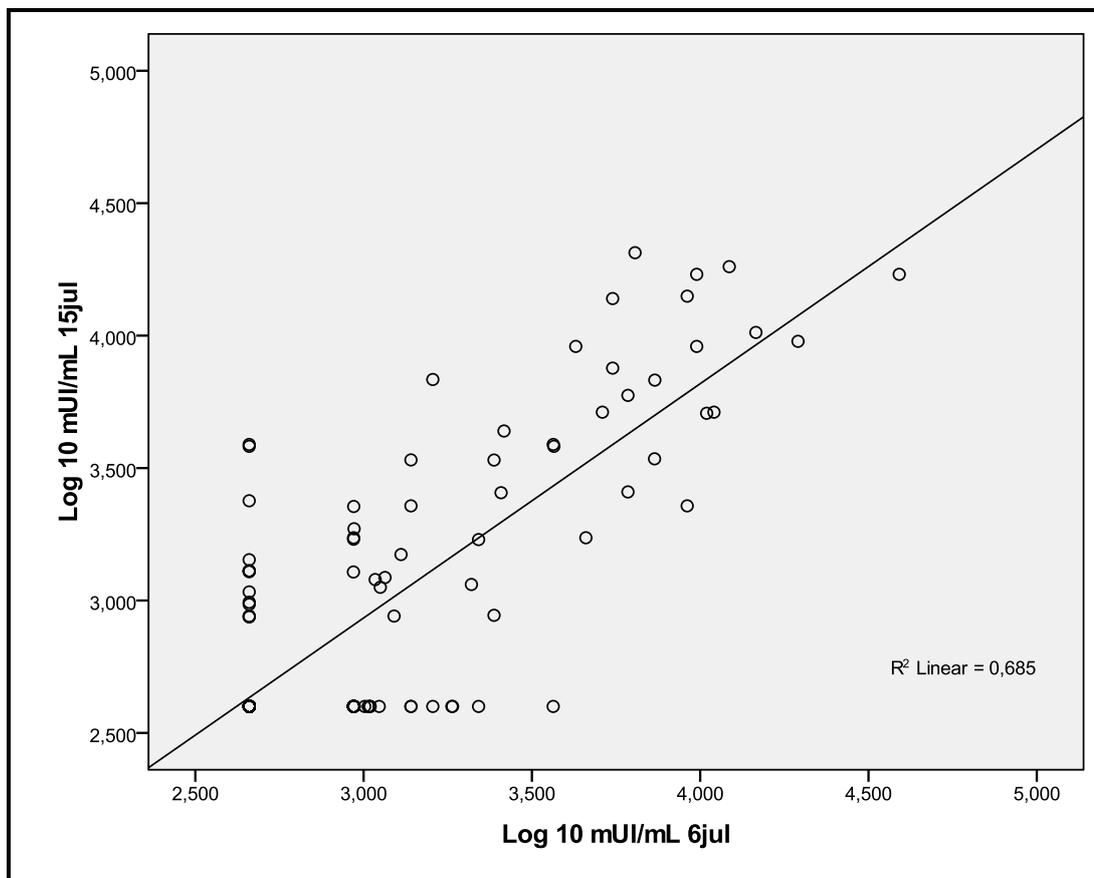
### 4.3.3 – Análises de confiabilidade do *micro PRNT*<sub>90</sub>

O bom desempenho do *micro PRNT*<sub>90</sub> sugeriu a avaliação da sua confiabilidade. A repetibilidade e a reprodutibilidade foram avaliadas, assim como para o *micro PRNT*<sub>50</sub>, determinando os Coeficientes de Correlação Intraclasse e os coeficientes de correlação de Pearson. O quadro 4.13 apresenta os CCIs obtidos da análise de repetibilidade das duplas operadoras.

**Quadro 4.13:** Análise de repetibilidade das duplas operadoras (considerando o EP90) analisada pelos Coeficientes de Correlação Intraclasse (CCI) obtidos a partir de três repetições independentes dos 200 soros submetidos ao *micro PRNT* por cada dupla. IC<sub>95%</sub> = Intervalo de confiança de 95%.

Dupla	CCI (IC <sub>95%</sub> )	CCI da Média (IC <sub>95%</sub> )
A	<b>0,79</b> (0,74-0,83)	0,92 (0,90-0,94)
B	<b>0,78</b> (0,73-0,83)	0,92 (0,89-0,93)
C	<b>0,79</b> (0,73-0,84)	0,92 (0,89-0,94)

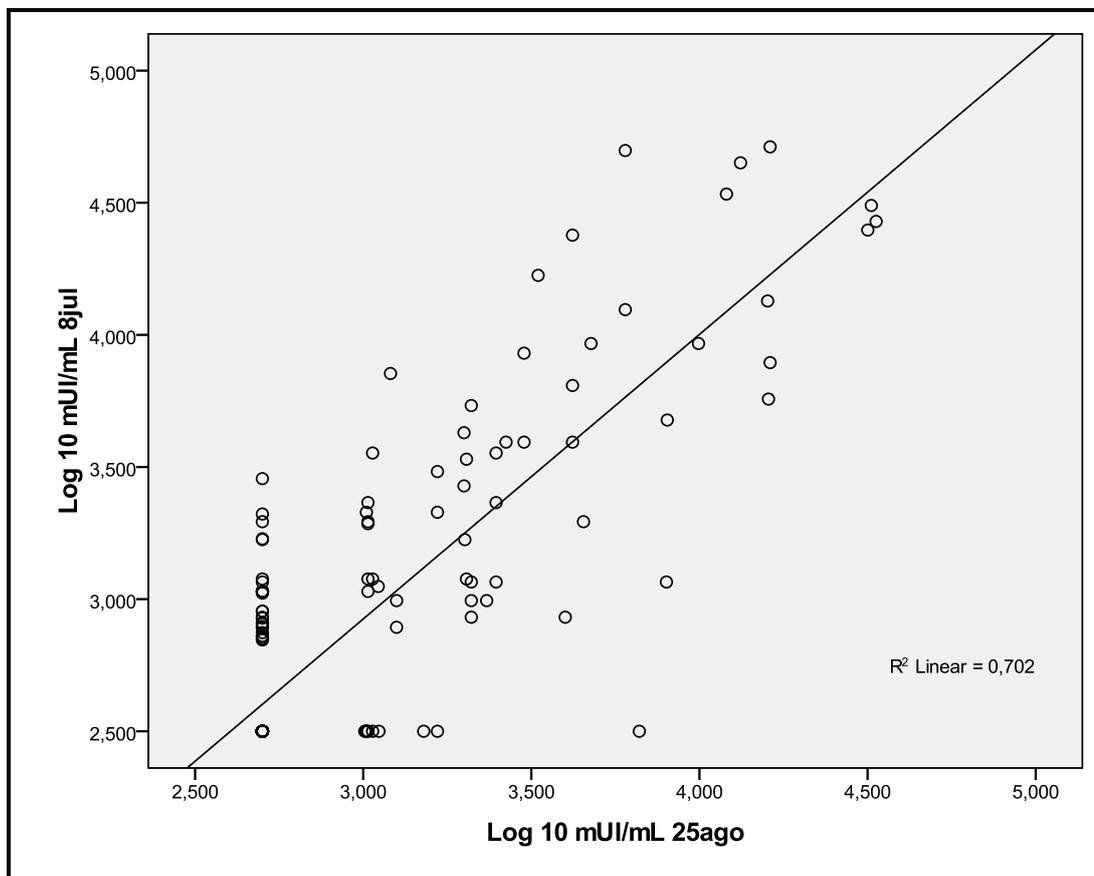
A análise de repetibilidade da dupla A resultou em um CCI de 0,79 (quadro 4.13) e os coeficientes de correlação de Pearson ficaram entre 0,76 e 0,83 (figura 4.11 e quadro 4.14). O CCI da dupla B foi de 0,78 (quadro 4.13) e os coeficientes de correlação de Pearson ficaram entre 0,78 e 0,84 (figura 4.12 e quadro 4.15). O CCI obtido da dupla C foi de 0,79 (quadro 4.13) e coeficientes de correlação de Pearson que variaram de 0,79 a 0,82 (figura 4.13 e quadro 4.16).



**Figura 4.11:** Gráfico de dispersão obtido no SPSS V.17.0 representativo das análises de repetibilidade da dupla A (EP90). No eixo X, os resultados (em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL) dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT no dia 06/07/2010. No eixo Y os resultados (em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL) dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT no dia 15/07/2010. O coeficiente de correlação linear de Pearson desta análise foi de 0,83.

**Quadro 4.14:** Coeficientes de correlação de Pearson dos resultados obtidos dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT pela dupla A (EP90).

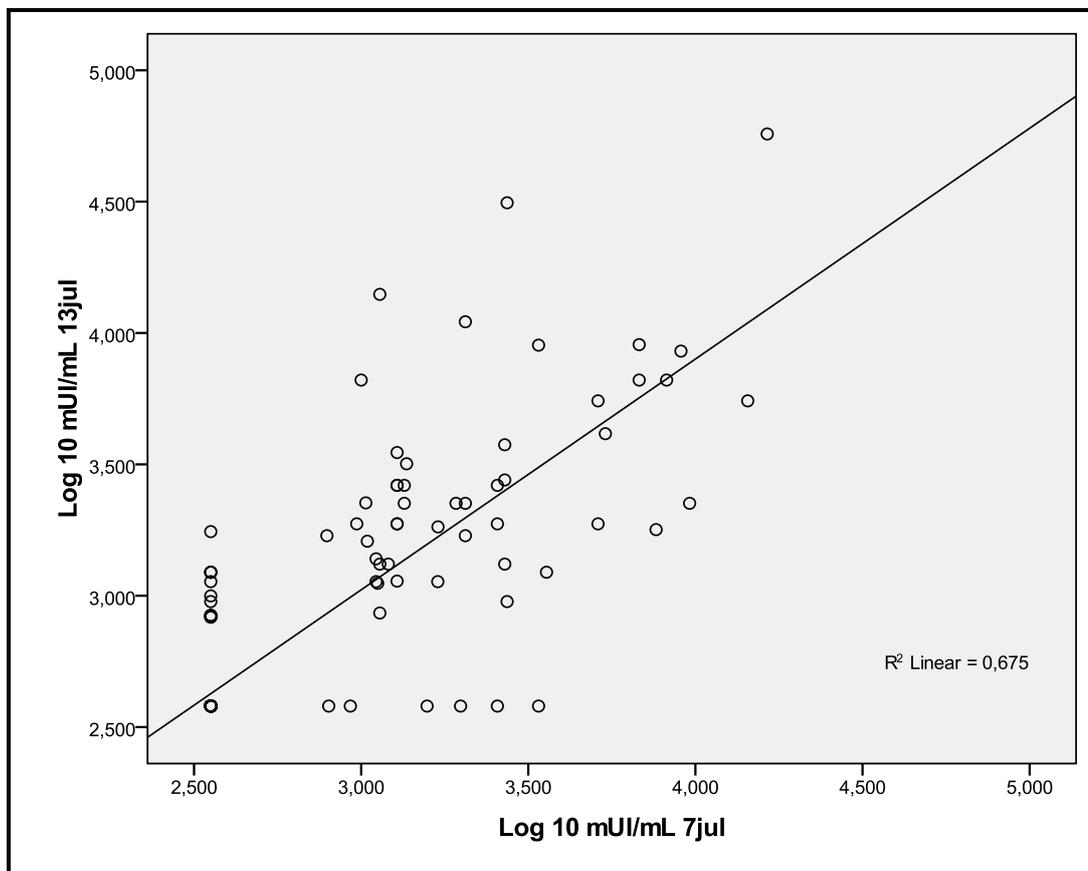
Variável Preditora (eixo X)	Variável Dependente (eixo Y)	Coefficiente de Correlação de Pearson
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 6 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 15 julho 2010	<b>0,83</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 6 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 2 agosto 2010	<b>0,81</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 15 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 6 julho 2010	<b>0,83</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 15 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 2 agosto 2010	<b>0,76</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 2 agosto 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 6 julho 2010	<b>0,81</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 2 agosto 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 15 julho 2010	<b>0,76</b>



**Figura 4.12:** Gráfico de dispersão obtido no SPSS V.17.0 representativo das análises de repetibilidade da dupla B (EP90). No eixo X, os resultados (em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL) dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT no dia 25/08/2010. No eixo Y os resultados (em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL) dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT no dia 08/07/2010. O coeficiente de correlação linear de Pearson desta análise foi de 0,84.

**Quadro 4.15:** Coeficientes de correlação de Pearson dos resultados obtidos dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT pela dupla B (EP90).

Variável Preditora (eixo X)	Variável Dependente (eixo Y)	Coefficiente de Correlação de Pearson
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 8 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 14 julho 2010	<b>0,78</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 8 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 25 agosto 2010	<b>0,84</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 14 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 8 julho 2010	<b>0,78</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 14 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 25 agosto 2010	<b>0,79</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 25 agosto 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 8 julho 2010	<b>0,84</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 25 agosto 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 14 julho 2010	<b>0,79</b>



**Figura 4.13:** Gráfico de dispersão obtido no SPSS V.17.0 representativo das análises de repetibilidade da dupla C (EP90). No eixo X, os resultados (em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL) dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT no dia 07/07/2010. No eixo Y os resultados (em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL) dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT no dia 13/07/2010. O coeficiente de correlação linear de Pearson desta análise foi de 0,82.

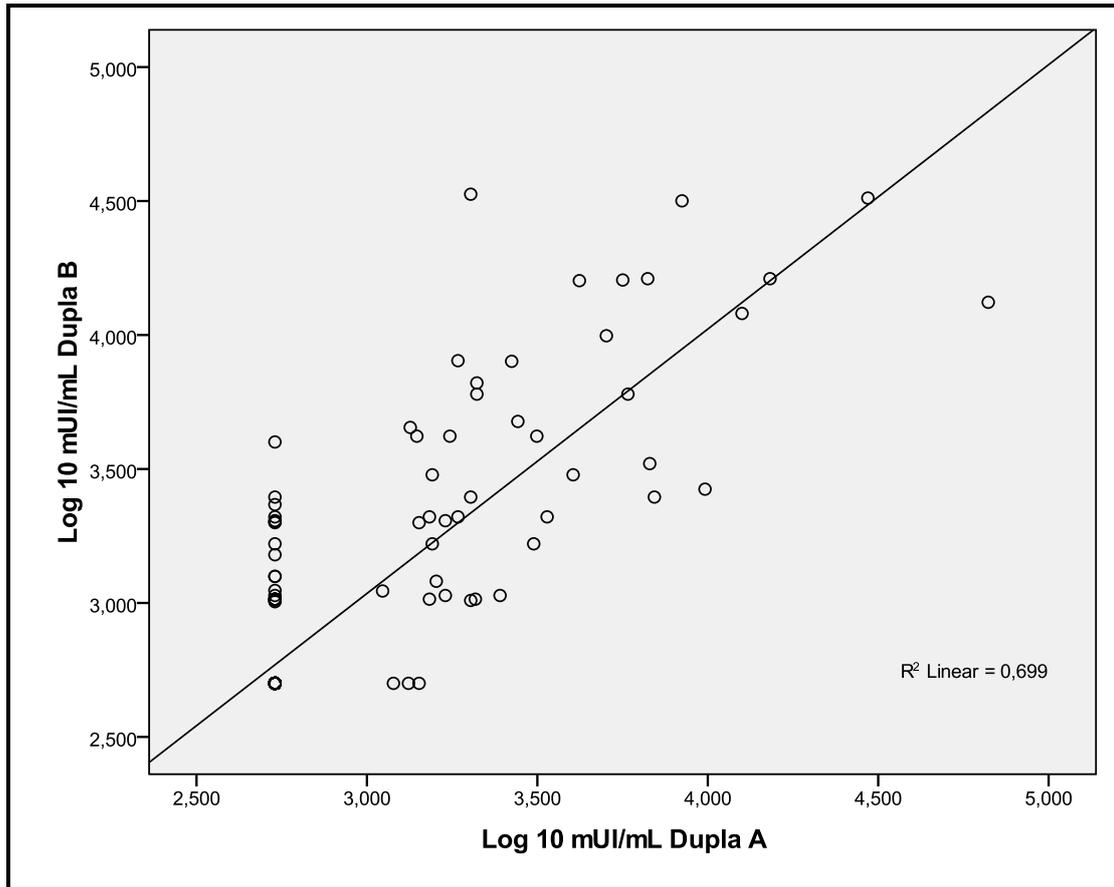
**Quadro 4.16:** Coeficientes de correlação de Pearson dos resultados obtidos dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT pela dupla C (EP90).

Variável Preditora (eixo X)	Variável Dependente (eixo Y)	Coefficiente de Correlação de Pearson
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 7 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 13 julho 2010	<b>0,82</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 7 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 3 agosto 2010	<b>0,79</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 13 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 7 julho 2010	<b>0,82</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 13 julho 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 3 agosto 2010	<b>0,82</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 3 agosto 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 7 julho 2010	<b>0,79</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 3 agosto 2010	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL de 13 julho 2010	<b>0,82</b>

Na análise de reprodutibilidade do *micro* PRNT<sub>90</sub>, o CCI obtido entre as três duplas foi de 0,81 (IC<sub>95%</sub>: 0,77-0,85) (quadro 4.17). O menor coeficiente de correlação de Pearson obtido foi 0,82 e o maior 0,84 (figura 4.14 e quadro 4.18).

**Quadro 4.17:** Coeficiente de Correlação Intraclasse (CCI) resultante da análise de reprodutibilidade do *micro* PRNT, considerando a 3ª rotina de cada dupla (EP90). IC<sub>95%</sub> = Intervalo de confiança de 95%.

Reprodutibilidade do	CCI (IC <sub>95%</sub> )	CCI da Média (IC <sub>95%</sub> )
<i>micro</i> PRNT	<b>0,81</b> (0,77-0,85)	0,93 (0,91-0,95)



**Figura 4.14:** Gráfico de dispersão obtido no SPSS V.17.0 representativo das análises de reprodutibilidade das duplas operadoras (EP90). No eixo X, os resultados (em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL) dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT da Dupla A (3ª rotina). No eixo Y os resultados (em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL) dos 200 soros submetidos ao *micro* PRNT da dupla B (3ª rotina). O coeficiente de correlação linear de Pearson desta análise foi de 0,84.

**Quadro 4.18:** Coeficientes de correlação de Pearson resultantes da análise de correlação do *micro* PRNT realizado pelas três duplas operadoras (considerando a 3ª rotina de cada dupla. EP90).

Variável Preditora (eixo X)	Variável Dependente (eixo Y)	Coefficiente de Correlação de Pearson
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla A	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla B	<b>0,84</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla A	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla C	<b>0,82</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla B	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla A	<b>0,84</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla B	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla C	<b>0,83</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla C	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla A	<b>0,82</b>
$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla C	$\text{Log}_{10}$ mUI/mL dupla B	<b>0,83</b>

#### 4.3.4 – Comparação das medidas de acurácia do *micro PRNT<sub>50</sub>* com o *micro PRNT<sub>90</sub>*

O quadro 4.19 permite fazer uma avaliação comparativa dos parâmetros de acurácia do *micro PRNT<sub>50</sub>* com ponto de corte de 2,9 Log<sub>10</sub> mUI/mL (quadro 4.11) contra o *micro PRNT<sub>90</sub>* com ponto de corte de 3,4 Log<sub>10</sub> mUI/mL (quadro 4.12).

**Quadro 4.19:** Comparação dos parâmetros de acurácia do *micro PRNT<sub>50</sub>* versus o *micro PRNT<sub>90</sub>* considerando os seus respectivos melhores pontos de corte para soropositividade. Teste referência: PRNT em placas de 6 poços.

	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Acurácia global</b>
<i>Micro PRNT<sub>50</sub></i> – Título ≥ <b>2,9</b> Log <sub>10</sub> mUI/mL	91,1%	72,9%	78%
<i>Micro PRNT<sub>90</sub></i> – Título ≥ <b>3,4</b> Log <sub>10</sub> mUI/mL	100%	94,7%	95%

O *micro PRNT<sub>90</sub>* mostrou melhor desempenho, apresentando valores melhores de confiabilidade e medidas de acurácia superiores ao *micro PRNT<sub>50</sub>*.

## 5. DISCUSSÃO

A febre amarela é uma doença viral transmitida ao homem através da picada de mosquitos hematófagos, principalmente dos gêneros *Aedes* e *Haemagogus* (Monath, 2001). Apesar de existir uma vacina eficaz contra o agente viral da FA desde 1937, esta enfermidade permanece como um problema de saúde pública em regiões endêmicas, principalmente, nas florestas tropicais da África e América do Sul, nas quais periodicamente ocorrem surtos ou epidemias da doença (Tomori, 2004).

A imunização por vacinação é a maneira mais eficaz de prevenção e controle da FA, sendo fundamental para impedir uma epidemia (OMS, 2009). As vacinas 17D-204 e 17DD são seguras e imunogênicas, induzindo a formação de uma rápida resposta imune específica (Camacho *et al.*, 2004). Dentre os testes sorológicos disponíveis para a avaliação desta resposta específica do hospedeiro, o teste de neutralização é considerado o mais sensível e específico (Monath, 2004).

Este estudo avaliou o desempenho do teste de neutralização por redução de placas de lise em placas de 96 poços (*micro* PRNT), o qual é utilizado para quantificar os anticorpos neutralizantes produzidos em resposta à vacinação ou à infecção natural com o vírus da FA. O *micro* PRNT é um teste importante para a análise de soroconversão das vacinas contra FA e confirmação de casos da doença. Uma avaliação mais detalhada do desempenho deste teste ainda não havia sido realizada.

A prévia titulação do vírus vacinal utilizado para a realização do *micro* PRNT mostrou que há uma variação frasco a frasco, onde foram obtidas placas com diluições de 1:512, 1:1000 (a maior parte) e 1:2048 correspondentes a 30 placas de lise por orifício do controle viral. Durante a realização desta quantificação viral observou-se também que três frascos do lote vacinal apresentaram, logo após serem reconstituídos, aspecto não conforme com o normal. Os frascos foram notificados e substituídos para a realização da titulação.

A observação do aspecto anormal dos frascos vacinais e a variação do título viral podem indicar a necessidade de se requerer um novo lote vacinal do vírus da FA para a realização dos testes de neutralização pelo Latev.

A variação frasco a frasco pode ser explicada pela presença de partículas não-infecciosas – as quais não são capazes de infectar células permissivas e, tampouco, induzir efeito citopático – em proporções diferentes em cada frasco do lote vacinal utilizado. Este lote vem sendo estocado por um longo período e, apesar de estar liofilizado e permanecer armazenado no freezer -70°C até o momento do seu uso, não deve-se descartar a possibilidade

de degradação viral ao longo do tempo. Portanto, a introdução de um controle do título referente ao estoque viral (determinação de partículas infecciosas presentes) é importante para evitar a utilização de vírus em degradação nos ensaios de placas de lise.

Os resultados obtidos do teste de neutralização normalmente são expressos em forma de títulos, ou seja, a diluição do soro que reduz o número de placas de lise em 50% (EP50), por exemplo. A concentração de anticorpos neutralizantes por conversão da recíproca da diluição referente ao EP do teste em Unidades Internacionais é outra maneira bastante utilizada de se expressar os resultados obtidos (Freire *et al.*, 2005; Suzano *et al.*, 2006; Camacho *et al.*, 2007; Gagneur *et al.*, 2008). A avaliação das médias, desvios-padrão e dos coeficientes de variação referentes aos nove resultados obtidos de cada soro pela três duplas (anexos 1 e 2) foi importante para definir a forma como os resultados seriam apresentados. Tomando como critério a quantidade de soros com coeficientes de variação referentes às suas médias abaixo de 20%, escolheu-se por apresentar os resultados em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL, forma na qual somente 20 soros apresentaram um CV maior que 20%; enquanto que resultados expressos em  $\text{Log}_{10}$  X (recíproca da diluição) apresentaram 106 soros com CV acima de 20%.

A validação do *micro* PRNT<sub>50</sub> (protocolo nº 4353) realizada pelo Sevan (Seção de Validação Analítica, Bio-Manguinhos) por solicitação da Anvisa avaliou a precisão do teste em dois níveis: repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial. A validação do teste foi executada em dois momentos diferentes por três analistas (tecnologistas, funcionárias do Latev, com pelo menos 1 ano de experiência na realização do *micro* PRNT). Cada um dos envolvidos fez, em um mesmo momento, 20 dosagens para três diferentes soros com níveis alto, médio e baixo para a concentração de anticorpos neutralizantes para FA. Os resultados obtidos foram expressos em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL e calculou-se as médias, as variâncias, os desvios-padrão e o coeficiente de variação (critério de aceitação: CV menor do que 20%). Os limites de repetibilidade e de reprodutibilidade foram calculados a partir dos desvios-padrão obtidos. Esta validação mostrou que os resultados dos testes avaliados pelo CV estão dentro da especificação de 20%; portanto, o *micro* PRNT<sub>50</sub> realizado no Latev foi aceito para a realização da quantificação de anticorpos neutralizantes para avaliar resposta vacinal ou confirmar casos da FA.

No presente estudo, para as análises de repetibilidade por CCI (quadro 4.1) foram obtidos valores satisfatórios (Szklo & Nieto, 2000): a dupla A obteve 0,64 (IC<sub>95%</sub>: 0,53-0,73), a dupla B obteve 0,62 (IC<sub>95%</sub>: 0,50-0,70) e a dupla C apresentou um CCI superior às demais duplas de 0,76 (IC<sub>95%</sub>: 0,70-0,81). Os coeficientes de correlação de Pearson das duplas operadoras variaram entre 0,62 e 0,78 (figuras 4.1, 4.2 e 4.3 e quadros 4.2, 4.3 e 4.4). Em 2004, Camacho juntamente com outros pesquisadores realizaram um ensaio clínico

randomizado de comparação da imunogenicidade das vacinas contra febre amarela 17DD e 17D. Os soros de indivíduos participantes deste estudo foram submetidos ao *micro* PRNT<sub>50</sub> realizado pelo Latev. Este estudo demonstrou um CCI (para os títulos de anticorpos em duas alíquotas do mesmo soro) de 0,79 (IC<sub>95%</sub>: 0,74-0,83), um valor coerente com o observado no presente estudo.

Na análise de reprodutibilidade do *micro* PRNT<sub>50</sub> entre as três duplas operadoras o CCI obtido (considerado satisfatório) foi de 0,72 (IC<sub>95%</sub>: 0,66-0,78) (quadro 4.5). Os valores dos coeficientes de correlação de Pearson variaram entre 0,70 e 0,76 (figura 4.4 e quadro 4.6).

Dr Bernard Cohen, especialista na validação do teste de neutralização em sarampo (Cohen *et al.*, 2007), não preconizou (em comunicação pessoal) a utilização de temperatura ambiente na etapa de neutralização do *micro* PRNT. Cohen discute que a “temperatura ambiente” não é uma temperatura bem estabelecida, sujeita às variações climáticas e que, portanto, é uma variável não controlada. Cohen também não recomenda a forma de retirada do sobrenadante antes da adição do meio semi-sólido (CMC), baseada na inversão das placas em um descarte, seguida da retirada do excesso em folhas de papel estéreis; outra variável considerada não controlada. Estas observações podem estar influenciando na variação frasco à frasco do título viral e nos diferentes resultados obtidos de um mesmo soro submetido ao *micro* PRNT e, portanto, devem ser considerados e avaliados.

Incubar as placas durante a etapa de neutralização em uma estufa a 37°C, assim como é aplicado para o PRNT, é uma alternativa para contornar o problema da variação da temperatura ambiente. Com relação ao descarte do sobrenadante após a etapa de adsorção, pode-se testar a utilização de monocamada pré-formada e a aspiração do sobrenadante, como também é aplicado para o PRNT. A qualidade da monocamada celular é crítica para o desenvolvimento das placas de lise e, assim, para gerar resultados precisos.

Antes da análise dos parâmetros de acurácia do *micro* PRNT foi preciso determinar um ponto de corte ideal para o PRNT em placas de 6 poços – método tomado como referência. A construção de um histograma com os resultados dos 200 soros submetidos ao PRNT (figura 4.5) possibilitou visualizar uma separação bem clara de soros com títulos de anticorpos neutralizantes menores e maiores do que 2,5 Log<sub>10</sub> mUI/mL (144 e 56 soros, respectivamente); e, portanto, escolheu-se este valor como ponto de corte para o PRNT.

A análise dos resultados dos soros submetidos ao PRNT gerou uma falsa impressão de que esta metodologia – em placas de 6 poços – apresentava falhas, pois a grande maioria dos soros tinha apresentado resultados com baixo título de anticorpos. Este cenário era bem diferente da prévia seleção dos soros a partir dos resultados obtidos em placas de 96 poços para o estudo clínico de dose-resposta, onde obteve-se uma distribuição igual de soros com

resultados de concentrações baixa, média e alta de anticorpos neutralizantes. Antes da abertura do “cegamento”, foi realizado um novo PRNT<sub>50</sub> com somente 10 soros (teste piloto) que já haviam sido submetidos ao PRNT<sub>50</sub> e que apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes menores que 2,5 Log<sub>10</sub> mUI/mL. A única diferença no protocolo deste teste piloto foi a diluição dos soros, na qual utilizou-se a mesma diluição aplicada no *micro* PRNT<sub>50</sub>, começando de 1:5 até 1:160 (fator 2). Com exceção de um soro (que apresentou título de anticorpos de 2,6 Log<sub>10</sub> mUI/mL), os outros nove soros apresentaram resultados menores do que 2,5 Log<sub>10</sub> mUI/mL (dados não mostrados), ratificando os primeiros resultados obtidos. A abertura do “cegamento” mostrou que os resultados obtidos do PRNT tinham de fato uma forte relação com o cenário real, onde 151 soros eram pré-vacinais e 49 pós-vacinais (figura 4.6). Esta constatação reforçou a determinação do PRNT em placas de 6 poços como o teste referência.

Diferente do que ocorre para o PRNT, na análise do *micro* PRNT não é possível observar uma população bem definida de soros com títulos baixos separados dos soros com títulos altos (figura 4.7). Para avaliar a acurácia do *micro* PRNT analisou-se o desempenho deste teste com diferentes pontos de corte, tomando como referência o PRNT<sub>50</sub> (quadros 4.7 a 4.11). O ponto de corte 2,9 Log<sub>10</sub> mUI/mL – correspondente ao título de anticorpos neutralizantes de 794 mUI/mL – para o *micro* PRNT<sub>50</sub> forneceu as melhores medidas de sensibilidade (91,1%), especificidade (72,9%) e acurácia global (78%); superiores às medidas referentes ao ponto de corte utilizado atualmente pelo Latev de 2,8 Log<sub>10</sub> mUI/mL (ou 631 mUI/mL), o qual apresentou sensibilidade de 94,6%, especificidade de 60,4% e acurácia global de 70%.

A construção da curva ROC (figura 4.8) foi outra forma de observar o melhor desempenho do *micro* PRNT<sub>50</sub> com o ponto de corte 2,9 Log<sub>10</sub> mUI/mL. Este ponto se localizou no canto superior esquerdo do gráfico e o mais distante da linha de referência, indicando, concomitantemente, uma melhor sensibilidade, especificidade (ou menor taxa de falsos positivos) e acurácia global.

A avaliação da prevalência e dos valores preditivos foi baseada em um cenário hipotético de surto de FA em uma região endêmica, por exemplo; onde os valores obtidos no PRNT<sub>50</sub> foram classificados como casos da doença (aqueles soros que resultaram positivos) ou não casos (aqueles soros que resultaram negativos). Considerando o ponto de corte de 2,9 Log<sub>10</sub> mUI/mL para o título de anticorpos neutralizantes determinados pelo *micro* PRNT<sub>50</sub>, obteve-se uma prevalência de 28% da febre amarela; valor bastante acima do normal inclusive para regiões endêmicas. No início de 2003, por exemplo, ocorreu uma epidemia de FAS em Minas Gerais, com 63 casos confirmados da doença. A região de ocorrência dos casos está

inserida em uma área de cerca de 85 mil km<sup>2</sup>, onde vivem aproximadamente 1 milhão de pessoas, o que corresponde a uma prevalência de FA de menos de 1% (SVS, 2003).

Os valores preditivos são influenciados pela sensibilidade e especificidade do teste e condicionados pela prevalência da doença. Quanto maior a sensibilidade do teste, maior será seu valor preditivo negativo, ou seja, maior a segurança de que um paciente com resultado negativo não estar realmente doente. De fato, observou-se um valor preditivo negativo (95,5%) maior do que o valor preditivo positivo (56,7%) para o *micro* PRNT<sub>50</sub> com uma sensibilidade maior do que a especificidade.

A observação de que outros grupos de pesquisa utilizam o *end-point* de 90% para suas análises de resultados obtidos de testes de neutralização (Niedrig *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2005; Santaella *et al.*, 2005; Dobler *et al.*, 2006; Sondgeroth *et al.*, 2007) incentivou a realização de uma avaliação comparativa dos parâmetros de acurácia entre o *micro* PRNT<sub>50</sub> e o *micro* PRNT<sub>90</sub>. Para tal foi preciso, primeiramente, determinar os pontos de corte para o PRNT<sub>90</sub> e o *micro* PRNT<sub>90</sub>.

A construção de um histograma de frequência com os resultados dos 200 soros submetidos ao PRNT<sub>90</sub> (figura 4.9) resultou em uma clara separação de soros com títulos de anticorpos neutralizantes menores e maiores do que 2,9 Log<sub>10</sub> mUI/mL, valor escolhido como ponto de corte para classificar os soros como soronegativos e soropositivos, respectivamente. O mesmo histograma foi feito com os resultados obtidos do *micro* PRNT<sub>90</sub> (figura 4.10) e, assim como ocorreu para o *micro* PRNT<sub>50</sub>, não foi possível visualizar uma separação dos soros negativos e positivos. Foram feitas análises das medidas de acurácia do *micro* PRNT<sub>90</sub> para diferentes pontos de corte (quadro 4.12) e o valor de 3,4 Log<sub>10</sub> mUI/mL apresentou os melhores resultados, com sensibilidade de 100%, especificidade de 94,7% e acurácia global de 95%.

No entanto, soropositividade definida como títulos iguais ou acima de 3,4 Log<sub>10</sub> mUI/mL ou 2512 mUI/mL maximizam sensibilidade e especificidade, mas classifica o controle positivo – que possui 3,05 Log<sub>10</sub> mUI/mL ou 1115 mUI/mL – como negativo (falso-negativo). A análise do desempenho do *micro* PRNT<sub>90</sub> com o ponto de corte de 3,0 Log<sub>10</sub> mUI/mL resultou em um teste mais sensível (quadro 4.12), porém, com especificidade menor (e menor probabilidade de falso-negativos), resultando na classificação do M7/100 (controle positivo) como verdadeiro-positivo.

O M7/100 é um padrão *in house* diluído 100 vezes para que fosse possível atribuir a ele um valor exato para a concentração de anticorpos (dentro dos limites de detecção do teste) quando submetido ao *micro* PRNT<sub>50</sub>. Quando titulado como M7 (forma não diluída) resultava

em uma diluição correspondente ao *end-point* muito alta, ultrapassando o limite de detecção do teste (maior do que 1:640).

Para a utilização do *micro* PRNT<sub>90</sub> deve-se avaliar a melhor combinação entre controle positivo e o ponto de corte ideais (ver quadro 4.12). A escolha do ponto 3,0 Log<sub>10</sub> mUI/mL resulta na perda de acurácia global, porém classifica verdadeiramente o padrão *in house* M7/100 como positivo para a presença de anticorpos para FA. O ponto 3,4 Log<sub>10</sub> mUI/mL fornece o melhor desempenho para o *micro* PRNT<sub>90</sub>, porém se faz necessário utilizar o padrão *in house* em sua forma menos diluída ou não diluída, resultando em uma maior concentração de anticorpos. Teoricamente, seria possível utilizar o M7 e determinar o seu título dentro dos limites de detecção do teste, considerando que o EP90 é mais restritivo e requer uma menor diluição do soro para que este seja capaz de reduzir a infecciosidade viral em 90%. Será necessário titular o M7 submetido ao *micro* PRNT<sub>90</sub> para confirmar esta hipótese.

As melhores medidas de acurácia encontradas para o *micro* PRNT<sub>90</sub> sugeriram uma avaliação da confiabilidade deste teste. Nas análises de repetibilidade, os CCIs obtidos (quadro 4.13) foram pouco diferentes entre as operadoras e superiores aos obtidos para o *micro* PRNT<sub>50</sub> (quadro 4.1). Os coeficientes de correlação de Pearson das duplas operadoras também foram melhores, variando entre 0,76 e 0,84 (figuras 4.11, 4.12 e 4.13 e quadros 4.14, 4.15 e 4.16). Na análise de reprodutibilidade do *micro* PRNT<sub>90</sub> entre as três operadoras, o CCI obtido de 0,81 (quadro 4.17) e os valores dos coeficientes de correlação de Pearson que variaram entre 0,82 e 0,84 (figura 4.14 e quadro 4.18) foram superiores às análises de reprodutibilidade do *micro* PRNT<sub>50</sub>.

Os pontos de corte do *micro* PRNT<sub>50</sub> e do *micro* PRNT<sub>90</sub> que resultam no melhor desempenho destes possibilitou fazer uma análise comparativa de acurácia entre eles (quadro 4.19). A avaliação dos valores obtidos mostra que a sensibilidade, a especificidade e a acurácia global do *micro* PRNT<sub>90</sub> foram superiores (100%; 94,7% e 95%, respectivamente) às referentes do *micro* PRNT<sub>50</sub> (91,1%; 72,9% e 78%, respectivamente).

Considerando que os 151 soros pré-vacinais eram realmente negativos para a presença de anticorpos neutralizantes contra FA, o melhor desempenho do *micro* PRNT<sub>90</sub> pode ser também observado pela análise da classificação dos soros (tomando 3,4 Log<sub>10</sub> mUI/mL como ponto de corte) onde 177 foram considerados soronegativos. Em contrapartida, o *micro* PRNT<sub>50</sub> (utilizando 2,9 Log<sub>10</sub> mUI/mL como ponto de corte) classificou 110 como soronegativos. Já era esperado que a aplicação do *end-point* de 90% fornecesse um maior número de soros com resultados negativos por ser um *end-point* mais restritivo, portanto, mais específico. Esses resultados evidenciam a melhor acurácia do *micro* PRNT<sub>90</sub>.

Os soros pós-vacinais do estudo dose-resposta apresentaram resultados (títulos de anticorpos neutralizantes) mais heterogêneos, pois os indivíduos participantes do estudo receberam diferentes doses da vacina. Vacinados que receberam dose vacinal baixa apresentaram proporção de soropositivos e títulos mais baixos daqueles que receberam doses mais altas da vacina.

A decisão se a forma de avaliação dos soros submetidos ao *micro* PRNT pelo Latev será modificada para o *end-point* de 90% deve ser cautelosa. Deve-se considerar que no caso da FA, a qual não possui tratamento específico (OMS, 2010) mas é uma doença de notificação obrigatória (Vasconcelos, 2003) um instrumento de alta sensibilidade é importante quando o teste objetiva identificar e fornecer cuidados de suporte aos casos. Por outro lado, um teste específico, o qual possui valor preditivo positivo elevado e menor probabilidade de se ter falsos positivos reduz as chances de se colocar um indivíduo em risco por falta de anticorpos protetores contra FA.

Este estudo mostrou a necessidade de se melhorar o *micro* PRNT. Modificações na metodologia do teste e alterações relacionadas aos critérios de classificação dos soros (utilização do melhor ponto de corte e redução da infecciosidade viral de 50% ou 90%) submetidos ao teste são pontos importantes a serem discutidos para melhorar a acurácia do *micro* PRNT.

## 6. CONCLUSÕES

- Os Coeficientes de Correlação Intraclasse obtidos para a análise de repetibilidade das duplas operadoras referentes ao *micro* PRNT<sub>50</sub> variaram entre 0,62 e 0,76. Estes valores de repetibilidade são considerados satisfatórios.
- O Coeficiente de Correlação Intraclasse para a avaliação de reprodutibilidade do *micro* PRNT<sub>50</sub> comparando os resultados obtidos das três duplas operadoras foi de 0,72. A reprodutibilidade do *micro* PRNT<sub>50</sub> também se mostrou satisfatória.
- O melhor ponto de corte para o *micro* PRNT<sub>50</sub> foi de 2,9 Log<sub>10</sub> mUI/mL (ou 794 mUI/mL) para a concentração de anticorpos neutralizantes contra febre amarela. Este valor apresentou as melhores medidas de acurácia: sensibilidade de 91,1%, especificidade de 72,9% e acurácia global de 78%.
- A análise da curva ROC com os possíveis pontos de corte para o *micro* PRNT<sub>50</sub> ratificou o valor de 2,9 Log<sub>10</sub> mUI/mL como aquele que confere o melhor desempenho para o teste.
- A comparação dos parâmetros de acurácia do *micro* PRNT<sub>50</sub> com o *micro* PRNT<sub>90</sub> mostrou que este último apresenta medidas de acurácia (sensibilidade de 100%, especificidade de 94,7% e acurácia global de 95%) superiores às referentes ao *micro* PRNT<sub>50</sub>.
- A acurácia do *micro* PRNT pode ser ampliada por meio de mudanças no processamento dos soros e obtenção das placas, e por alterações nos critérios de classificação nas leituras das placas obtidas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK , Lichtman AH & Pillai S. **Imunologia celular e molecular**. 6nd. ed. Elsevier; 2008.

Abramson, J.H. **WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists**. *Epidemiologic Perspectives & Innovations* 2004; 1:6

Benchimol JL. **Febre amarela: a doença e a vacina, uma história inacabada**. Rio de Janeiro: Editora Fundação Oswaldo Cruz; 2001.

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

Calisher CH, Beaty BJ & Chandler LJ. **Arboviruses**. In: Lennette EH & Smith TF, editors. **Laboratory diagnosis of viral infections**. 3nd. ed. New York: Marcel Dekker, Inc; 1999. p.305-32.

Camacho LA, Freire MS, Leal MLF, Aguiar SG, Nascimento JP, Iguchi T, Lozana JA, Farias RH; Collaborative Group for the Study of Yellow Fever Vaccines. **Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17DD yellow fever vaccines: a randomized trial**. *Rev Saude Publica* 2004; 38(5):671-8.

Camacho LAB, Freire MS, Leal MLF, Maia MLS & Martins RM, Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine. **Randomized, double-blind, multicenter study of the immunogenicity and reactogenicity of 17DD and WHO 17D-213/77 yellow fever vaccines in children: implications for the Brazilian National Immunization Program**. *Vaccine* 2007; 25(16):3118-23.

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R & Rice CM. **Flavivirus genome organization, expression, and replication**. *Annual Reviews of Microbiology* 1990; 44:649-88.

Chiong MA. **Dr. Carlos Finlay and yellow fever**. *The Journal of Clinical Investigation* 1989; 141(11):1126.

Cohen BJ, Audet S, Andrews N, Beeler J, WHO Working Group on Measles Plaque Reduction Neutralization Test. **Plaque reduction neutralization test for measles antibodies: Description of a standardised laboratory method for use in immunogenicity studies of aerosol vaccination**. *Vaccine* 2007; 26(1):59-66.

Cohen J. **A coefficient of agreement for nominal scales**. *Educ Psychol Meas* 1960; 20:37.

De Madrid AT & Porterfield JS. **A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses**. *Bull World Health Organ* 1969; 40(1):113-21.

Deubel V, Mouly V, Salaun JJ, Adam C, Diop MM & Digoutte JP. **Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with standard tests used to detect yellow fever virus antibodies**. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32(3):565-8.

Dobler G, Wölfel R, Schmüser H, Essbauer S & Pfeffer M. **Seroprevalence of tick-borne and mosquito-borne arboviruses in European brown hares in Northern and Western Germany.** *Int J Med Microbiol* 2006; 296:80-3.

Dulbecco R. **Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1952; 38(8):747-52.

Fox JP. **Immunity to yellow fever encephalitis of monkeys and mice immunized by neural and extraneural routes.** *J Exp Med* 1943a; 77(6):487-506.

Fox JP. **Non-fatal infection of mice following intracerebral inoculation of yellow fever virus.** *J Exp Med* 1943b; 77(6):507-20.

Freire MS, Mann GF, Marchevsky RS, Yamamura AM, Almeida LF, Jabor AV, Malachias JM, Coutinho ES & Galler R. **Production of yellow fever 17DD vaccine virus in primary culture of chicken embryo fibroblasts: yields, thermo and genetic stability, attenuation and immunogenicity.** *Vaccine* 2005; 23(19):2501-12.

Funasa – Fundação Nacional de Saúde. **Manual de vigilância epidemiológica de febre amarela.** Ministério da Saúde 1999. (Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manu\\_feam.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manu_feam.pdf)).

Galler R, Post PR, Santos CN & Ferreira II. **Genetic variability among yellow fever virus 17D substrains.** *Vaccine* 1998; 16(9-10):1024-8.

Galler R, Pugachev KV, Santos CL, Ocran SW, Jabor AV, Rodrigues SG, Marchevsky RS, Freire MS, Almeida LF, Cruz AC, Yamamura AM, Rocco IM, da Rosa ES, Souza LT, Vasconcelos PF, GuiraKhoo F & Monath TP. **Phenotypic and molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil.** *Virology* 2001; 290(2):309-19.

Gagneur A, Pinquier D, Aubert M, Balu L, Brissaud O, De Pontual L, Gras Le Guen C, Hau-Rainsard I, Mory O, Picherot G, Stephan JL, Cohen B, Caulin E, Soubeyrand B & Reinert P. **Kinetics of decline of maternal measles virus-neutralizing antibodies in sera of infants in France in 2006.** *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15(12):1845-50.

Greiner M, Pfeiffer D & Smith RD. **Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests.** *Preventive Veterinary Medicine* 2000; 45:23-41.

Groot H & Ribeiro RB. **Neutralizing and haemagglutination-inhibiting antibodies to yellow fever 17 years after vaccination with 17D vaccine.** *Bull World Health Organ* 1962; 27:699-707.

Gubler DJ. **The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle?** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27(5):319-30.

Hatanaka VMA & Benseñor IM. **Avaliação de testes diagnósticos.** In: Benseñor IM & Lotufo PA, editors. **Epidemiologia – Abordagem prática.** 1nd. ed. São Paulo: Sarvier; 2005. p.221-244.

Heather LVE. **Broadening the horizons for yellow fever: new uses for an olde vaccine.** JEM 2005; 201(2):165-8.

Heinz FX. **Epitope mapping of flavivirus glycoproteins.** Adv Virus Res 1986; 31:103-68.

Jekel JF, Elmore JG & Katz DL. **Entendendo e reduzindo erros em medicina clínica.** In: Jekel JF, Elmore JG, Katz DL, editors. **Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva.** Porto Alegre: Artmed; 1999. p.99-112.

Johnson BW, Kosoy O, Martin DA, Noga AJ, Russell BJ, Johnson AA & Petersen LR. **West Nile virus infection and serologic response among persons previously vaccinated against yellow fever and Japanese encephalitis viruses.** Vector Borne Zoonotic Dis 2005; 5(2):137-45.

Leeflang MM, Bossuyt PM & Irwig L. **Diagnostic test accuracy may vary with prevalence: implications for evidence-based diagnosis.** J Clin Epidemiol 2008; 62(1):5-12.

Lindenbach BD & Rice CM. **Flaviviridae: the viruses and their replication.** In: Knipe DM & Howley PM, editors. **Virology.** 4nd. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p.991-1041.

Lopes PA. **Estatística aplicada à análise de resultados de ensaios de proficiência na avaliação de laboratórios.** Caderno de atividades. Anvisa. Instituto adolpho Lutz 2003.

Mcgraw KO & Wong SP. **Forming Inferences About Some Intraclass Correlation Coefficients.** Psychological Methods 1996; 1(1):30-46.

Marchevsky RS, Freire MS, Coutinho ES, & Galler R. **Neurovirulence of yellow fever 17DD vaccine virus to rhesus monkeys.** Virology 2003; 316(1):55-63.

Marchevsky RS, Leal ML, Homma A, Coutinho ES, Coutinho ES, Camacho LA, Jabor AV, Galler R & Freire MS. **Molecular and phenotypic analysis of a working seed lot of yellow fever virus 17DD vaccine strain produced from the secondary seed lot 102/84 with an additional passage in chicken embryos.** Biologicals 2006; 34(3):191-7.

Monath TP, Craven RB, Muth DJ, Trautt CJ, Calisher CH & Fitzgerald AS. **Limitations of the complement-fixation test for distinguishing naturally acquired from vaccine-induced yellow fever infection in flavivirus-hyperendemic areas.** Am J Trop Med Hyg 1980; 29(4):624-34.

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

Monath TP. **Yellow fever vaccine.** In: Plotkin S, Orenstein WA, editors. **Vaccines.** 4nd. ed. Philadelphia: Elsevier; 2004. p.1095-1176.

Mutebi JP, Wang H, Li L, Bryant JE & Barrett ADT. **Phylogenetic and evolutionary relationships among yellow fever virus isolates in Africa.** Journal of Virology 2001; 75(15):6999-7008.

Niedrig M, Lademann M, Emmerich P & Lafrenz M. **Assessment of IgG antibodies against yellow fever virus after vaccination with 17D by different assays: neutralization test,**

- haemagglutination inhibition test, immunofluorescence assay and ELISA.** Trop Med Int Health 1999; 4(12):867-71.
- Niedrig M, Kürsteiner O, Herzog C & Sonnenberg K. **Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against yellow fever virus.** Clin Vaccine Immunol 2008; 15(2):177-81.
- Nogueira RM, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Cavalcanti SM & de Carvalho R. **Use of MAC-ELISA for evaluation of yellow fever vaccination.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1992; 34(5):447-50.
- OPAS – Organização Pan-americana da Saúde. **Situación de la fiebre amarilla en las Américas.** Actualización 2009. (Disponível em <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/eid-eer-2009-02-10.pdf>).
- Porterfield JS. **A plaque technique for the titration of yellow fever virus and antisera.** Trans R Soc Trop Med Hyg 1959; 53(6):458-66.
- Roehrig JT, Hombach J & Barrett AD. **Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses.** Viral Immunol 2008; 21(2):123-32.
- Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SH & Strauss JH. **Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution.** Science 1985; 229(4715):726-33.
- Robertson S. **Yellow fever.** The immunological basis for immunization series, WHO 1993. (Disponível em [http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF-IBI-e/mod8\\_e.pdf](http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF-IBI-e/mod8_e.pdf)).
- Romanos MTV. **Febre amarela e dengue.** In: Santos NSO, Romanos MTV & Wigg MD, editors. **Introdução à virologia humana.** 2nd. ed. Guanabara Koogan S.A.; 2008. p.399-408.
- Santaella J, McLean R, Hall JS, Gill JS, Bowen RA, Hadow HH & Clark L. **West Nile virus serosurveillance in Iowa white-tailed deer (1999-2003).** Am J Trop Med Hyg 2005; 73(6):1038-42.
- Santos NOS & Benati FJ. **Diagnóstico laboratorial das viroses.** In: Santos NSO, Romanos MTV & Wigg MD, editors. **Introdução à virologia humana.** 2nd. ed. Guanabara Koogan S.A.; 2008. p.83-116.
- Sawyer WA & Lloyd W. **The of mice in testes of immunity against yellow fever.** J Exp Med 1931; 54(4):533-55.
- Schoub BD & Blackburn NK. **Flaviviruses.** In: Zuckerman AJ, Banatvala JE & Pattison JR, editors. **Principles and practice of clinical virology.** 3rd. ed. Jonh Wiley & Sons Ltd; 1995.
- Sondgeroth K, Blitvich B, Blair C, Terwee J, Junge R, Sauter M & VandeWoude S. **Assessing flavivirus, lentivirus, and herpesvirus exposure in free-ranging ring-tailed lemurs in southwestern Madagascar.** J Wildl Dis 2007; 43(1):40-7.
- Stefano I, Sato HK, Pannuti CS, Omoto TM, Mann G, Freire MS, Yamamura AM, Vasconcelos PF, Oselka GW, Weckx LW, Salgado MF, Noale LF & Souza VA. **Recent**

**immunization against measles does not interfere with the sero-response to yellow fever vaccine.** *Vaccine* 1999; 17(9-10):1042-6.

Suzano CE, Amaral E, Sato HK, Papaiordanou PM, Campinas Group on Yellow Fever Immunization during Pregnancy. **The effects of yellow fever immunization (17DD) inadvertently used in early pregnancy during a mass campaign in Brazil.** *Vaccine* 2006; 24(9):1421-6.

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde. **Epidemia de febre amarela silvestre na região da bacia do Rio Doce – Minas Gerais. Dezembro de 2002 a março de 2003.** *Boletim Eletrônico Epidemiológico* 2003; 3(6): 1-5. (Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_eletronico\\_06\\_ano03.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico_06_ano03.pdf)).

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica – Febre amarela.** Normas e Manuais Técnicos 2005. (Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/febre\\_amarela\\_gve.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/febre_amarela_gve.pdf)).

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação da febre amarela silvestre no Brasil, 2007 e 2008.** *Boletim Diário SVS* 2008a. (Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_febre\\_amarela\\_30\\_jan\\_2008\\_x.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_febre_amarela_30_jan_2008_x.pdf)).

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Vigilância e Controle da Febre Amarela.** Grupo Técnico das Arboviroses 2008b. (Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Febre%20Amarela-site-SVS-31out2008.pdf>).

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde. **Febre amarela silvestre, Estado de São Paulo, 2009.** *Boletim de Atualização* 2009. (Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Boletim\\_FA\\_SP\\_08\\_2009CVE.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Boletim_FA_SP_08_2009CVE.pdf)).

Szklo M & Nieto FJ. **Quality assurance and control.** In: Szklo M & Nieto FJ, editors. **Epidemiology: beyond the basics.** Maryland: Aspen Publishers; 2000. p.343-404.

Theiler M & Casals J. **The serological reactions in yellow fever.** *Am J Trop Med Hyg* 1958; 7(6):585-94.

Theiler M & Smith HH. **The effect of prolonged cultivation in vitro upon the pathogenicity of yellow fever virus.** *J Exp Med* 1937; 65(6):767-86.

Toledo GL & Ovalle II. **Medidas de dispersão.** In: Toledo GL & Ovalle II, editors. **Estatística Básica.** 2nd. ed. Atlas S.A.; 1995a. p.181-226.

Toledo GL & Ovalle II. **Correlação e regressão.** In: Toledo GL & Ovalle II, editors. **Estatística Básica.** 2nd. ed. Atlas S.A.; 1995b. p.412-457.

Tomori O. **Yellow fever: the recurring plague.** *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004; 41(4):391-427.

Vasconcelos PF. **Febre Amarela.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36(2):275-93.

Vasconcelos PFC, Bryant JE, Travassos da Rosa APA, Tesh RB, Rodrigues SG & Barret ADT. **Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus, Brasil.** *Emerging Infectious Disease* 2004; 10(9):1578-84.

Wang E, Weaver SC, Shope RE, Tesh RB, Watts DM & Barrett ADT. **Genetic variation in yellow fever virus: duplication in the 3' noncoding region of strains from Africa.** Virology 1996; 225(2):274-81.

Whitman L. **A modified intraperitoneal protection test for yellow fever based on the greater susceptibility of immature white mice to the extraneural injection of yellow fever virus.** Am J Trop Med 1943; s1-23(1):17-36.

WHO – World Health Organization. **Manual for the monitoring of yellow fever virus infection.** Department of Immunization, vaccines and biologicals 2004. (Disponível em [http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO\\_IVB\\_04.08.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_IVB_04.08.pdf)).

Zanotto PM, Gould EA, Gao GF, Harvey PH & Holmes EC. **Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies.** Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93(2):548-53.

Sites consultados:

- [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=26933](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=26933)  
(SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010. Capturado em 14.01.10).

- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>  
(WHO – World Health Organization, 2009. Capturado em 17.01.2010).

- <http://www.who.int/csr/disease/yellowfev/impact/en/>  
(WHO – World Health Organization, 2010. Capturado em 24.01.2010).

- <http://www.paho.org/English/ad/dpc/cd/eid-eer-2008-02-25.htm>  
(OPAS – Organização Pan-americana da Saúde, 2008. Capturado em 22.06.2010).

- [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/898\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/898_03re.htm)  
(ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003. Capturado em 24.01.2011).

## 8. ANEXOS

**Anexo 1:** Quadro com as médias dos resultados (expressos em  $\text{Log}_{10} X$  – recíproca da diluição), desvios-padrão (DP) e coeficientes de variação (CV) das 9 rotinas do *micro* PRNT (96 poços) dos 200 soros.

Amostras	Médias	DP	CV (%)	Amostras	Médias	DP	CV (%)
20002	1,048	0,392	37,432	20631	0,957	0,515	53,796
20006	1,270	0,337	26,577	20632	1,957	0,358	18,279
20007	1,446	0,335	23,146	20633	1,183	0,471	39,859
20008	0,877	0,513	58,488	20636	1,250	0,527	42,191
20011	1,302	0,420	32,281	20639	1,480	0,451	30,476
20012	0,707	0,412	58,248	20644	1,590	0,446	28,018
20014	0,664	0,434	65,352	20660	2,278	0,306	13,416
20017	1,537	0,460	29,931	20747	1,377	0,393	28,554
20041	1,112	0,468	42,043	20749	1,353	0,412	30,445
20044	1,039	0,507	48,764	20750	2,539	0,188	7,401
20046	1,501	0,515	34,285	20753	1,814	0,232	12,791
20047	0,829	0,340	41,040	20761	1,811	0,331	18,300
20048	0,552	0,315	57,031	20762	0,665	0,264	39,703
20049	1,389	0,552	39,747	20763	2,309	0,289	12,535
20050	1,636	0,381	23,323	20774	0,965	0,438	45,419
20054	1,726	0,534	30,926	20775	2,436	0,227	9,312
20058	1,145	0,454	39,680	20778	1,677	0,367	21,905
20059	1,652	0,329	19,929	20786	2,776	0,081	2,932
20066	0,999	0,562	56,240	20787	2,387	0,214	8,959
20070	1,633	0,496	30,410	20793	2,242	0,158	7,063
20071	1,707	0,256	15,002	20801	1,209	0,586	48,485
20073	1,527	0,325	21,310	20804	1,143	0,394	34,429
20075	1,843	0,224	12,137	20831	1,416	0,546	38,555
20076	1,669	0,301	18,052	20832	1,978	0,187	9,470
20077	1,826	0,375	20,539	20835	2,803	0,014	0,507
20078	1,508	0,558	37,001	20840	2,205	0,422	19,126
20083	1,138	0,542	47,637	20845	1,727	0,390	22,608
20088	1,658	0,333	20,107	20850	2,634	0,154	5,853
20138	1,514	0,204	13,511	20871	2,719	0,105	3,853
20141	1,484	0,307	20,721	20885	2,617	0,220	8,419
20148	1,453	0,605	41,648	20886	2,413	0,250	10,345
20150	0,678	0,337	49,612	20898	1,462	0,355	24,289
20152	1,608	0,457	28,407	20901	2,305	0,272	11,787
20154	1,957	0,308	15,741	20919	2,697	0,210	7,790
20161	1,006	0,547	54,389	20952	1,922	0,394	20,496
20162	2,072	0,458	22,117	20959	1,840	0,344	18,684
20164	2,093	0,398	19,000	20966	1,869	0,336	17,987
20184	2,776	0,053	1,905	20970	0,857	0,469	54,754
20192	2,023	0,320	15,843	20981	1,593	0,219	13,776
20194	2,176	0,427	19,642	20984	1,666	0,337	20,247

<b>20199</b>	1,796	0,322	17,930	<b>20996</b>	1,372	0,532	38,790
<b>20200</b>	1,121	0,531	47,331	<b>21086</b>	1,071	0,578	53,959
<b>20203</b>	1,676	0,402	23,974	<b>21102</b>	1,906	0,337	17,698
<b>20208</b>	1,979	0,277	13,986	<b>21105</b>	1,927	0,230	11,937
<b>20217</b>	2,810	0,000	0,000	<b>21123</b>	1,888	0,462	24,485
<b>20218</b>	2,795	0,026	0,922	<b>21174</b>	1,907	0,258	13,555
<b>20258</b>	1,553	0,330	21,257	<b>21202</b>	1,922	0,374	19,445
<b>20259</b>	2,123	0,459	21,630	<b>21217</b>	2,059	0,189	9,201
<b>20263</b>	2,009	0,257	12,797	<b>21303</b>	1,798	0,412	22,939
<b>20267</b>	1,732	0,635	36,673	<b>21306</b>	2,085	0,339	16,283
<b>20275</b>	1,055	0,549	51,990	<b>21337</b>	1,412	0,350	24,766
<b>20345</b>	2,629	0,164	6,222	<b>21340</b>	1,528	0,370	24,225
<b>20347</b>	1,736	0,476	27,403	<b>21342</b>	1,331	0,215	16,163
<b>20348</b>	1,569	0,556	35,437	<b>21366</b>	1,994	0,228	11,421
<b>20351</b>	1,499	0,526	35,122	<b>21389</b>	1,745	0,286	16,364
<b>20353</b>	1,987	0,555	27,938	<b>21401</b>	1,840	0,314	17,093
<b>20356</b>	1,475	0,585	39,648	<b>21611</b>	2,178	0,292	13,411
<b>20358</b>	2,202	0,308	13,973	<b>21764</b>	2,186	0,265	12,098
<b>20366</b>	1,701	0,551	32,382	<b>21790</b>	1,908	0,265	13,873
<b>20368</b>	1,662	0,456	27,421	<b>21807</b>	0,715	0,416	58,219
<b>20370</b>	1,302	0,670	51,460	<b>21823</b>	1,235	0,473	38,263
<b>20377</b>	1,436	0,277	19,322	<b>21881</b>	1,571	0,444	28,248
<b>20380</b>	1,947	0,394	20,257	<b>21888</b>	1,752	0,381	21,752
<b>20381</b>	1,903	0,357	18,745	<b>21902</b>	1,679	0,335	19,979
<b>20387</b>	1,569	0,306	19,495	<b>21917</b>	2,073	0,313	15,081
<b>20389</b>	1,763	0,327	18,545	<b>21918</b>	1,639	0,649	39,595
<b>20393</b>	1,260	0,459	36,397	<b>21985</b>	2,507	0,166	6,615
<b>20395</b>	1,572	0,245	15,598	<b>22064</b>	2,181	0,203	9,297
<b>20396</b>	2,015	0,157	7,811	<b>22066</b>	1,848	0,226	12,218
<b>20400</b>	1,715	0,382	22,266	<b>22076</b>	0,946	0,451	47,708
<b>20406</b>	1,846	0,299	16,183	<b>22086</b>	1,655	0,327	19,768
<b>20407</b>	2,263	0,267	11,790	<b>22093</b>	0,904	0,445	49,277
<b>20408</b>	1,197	0,402	33,542	<b>22103</b>	1,593	0,362	22,710
<b>20412</b>	1,456	0,536	36,828	<b>22140</b>	1,881	0,264	14,014
<b>20415</b>	1,469	0,493	33,604	<b>22153</b>	0,880	0,460	52,224
<b>20419</b>	1,422	0,521	36,642	<b>22200</b>	2,409	0,318	13,216
<b>20421</b>	2,114	0,187	8,831	<b>22232</b>	1,607	0,285	17,745
<b>20426</b>	2,066	0,233	11,275	<b>22283</b>	2,025	0,398	19,654
<b>20439</b>	2,454	0,233	9,502	<b>22302</b>	1,367	0,480	35,077
<b>20441</b>	2,096	0,296	14,105	<b>22305</b>	1,466	0,515	35,145
<b>20448</b>	1,367	0,319	23,343	<b>22311</b>	1,245	0,314	25,196
<b>20450</b>	1,259	0,395	31,361	<b>22321</b>	1,437	0,531	36,987
<b>20453</b>	2,807	0,010	0,343	<b>22332</b>	1,715	0,251	14,650
<b>20457</b>	1,073	0,468	43,623	<b>22335</b>	2,204	0,343	15,548
<b>20458</b>	2,199	0,159	7,233	<b>22400</b>	1,702	0,388	22,776
<b>20501</b>	2,795	0,038	1,371	<b>22402</b>	1,466	0,452	30,813

<b>20544</b>	1,500	0,397	26,452	<b>22414</b>	1,016	0,492	48,416
<b>20547</b>	1,227	0,377	30,757	<b>22419</b>	1,006	0,417	41,391
<b>20561</b>	2,055	0,295	14,342	<b>22429</b>	1,687	0,296	17,555
<b>20569</b>	1,219	0,454	37,219	<b>22476</b>	2,132	0,232	10,897
<b>20572</b>	1,611	0,289	17,944	<b>22487</b>	1,608	0,247	15,352
<b>20578</b>	1,960	0,342	17,454	<b>22488</b>	2,039	0,298	14,625
<b>20585</b>	1,919	0,316	16,474	<b>22493</b>	2,765	0,136	4,907
<b>20590</b>	0,784	0,391	49,915	<b>22502</b>	2,576	0,216	8,385
<b>20593</b>	1,040	0,452	43,451	<b>22571</b>	1,578	0,266	16,869
<b>20598</b>	1,566	0,223	14,226	<b>22596</b>	2,050	0,308	15,007
<b>20610</b>	1,507	0,463	30,726	<b>22601</b>	1,658	0,291	17,538
<b>20613</b>	1,270	0,496	39,031	<b>22604</b>	2,134	0,183	8,589
<b>20624</b>	1,165	0,480	41,202	<b>22623</b>	1,289	0,298	23,120
<b>20626</b>	1,688	0,306	18,108	<b>22634</b>	1,292	0,419	32,397

**Anexo 2:** Quadro com as médias dos resultados (expressos em  $\text{Log}_{10}$  mUI/mL), desvios-padrão (DP) e coeficientes de variação (CV) das 9 rotinas do *micro* PRNT (96 poços) dos 200 soros.

<b>Amostras</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Amostras</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>CV (%)</b>
<b>20002</b>	2,239	0,282	12,618	<b>20631</b>	2,149	0,428	19,913
<b>20006</b>	2,461	0,292	11,877	<b>20632</b>	3,148	0,230	7,314
<b>20007</b>	2,636	0,325	12,346	<b>20633</b>	2,374	0,376	15,834
<b>20008</b>	2,068	0,457	22,103	<b>20636</b>	2,441	0,486	19,925
<b>20011</b>	2,494	0,323	12,952	<b>20639</b>	2,671	0,370	13,846
<b>20012</b>	1,898	0,353	18,577	<b>20644</b>	2,782	0,431	15,503
<b>20014</b>	1,856	0,353	19,034	<b>20660</b>	3,470	0,206	5,931
<b>20017</b>	2,727	0,353	12,953	<b>20747</b>	2,568	0,372	14,466
<b>20041</b>	2,303	0,361	15,688	<b>20749</b>	2,544	0,328	12,908
<b>20044</b>	2,230	0,406	18,214	<b>20750</b>	3,730	0,143	3,830
<b>20046</b>	2,692	0,430	15,958	<b>20753</b>	3,005	0,192	6,379
<b>20047</b>	2,020	0,363	17,962	<b>20761</b>	3,002	0,217	7,223
<b>20048</b>	1,743	0,254	14,590	<b>20762</b>	1,856	0,339	18,269
<b>20049</b>	2,579	0,471	18,277	<b>20763</b>	3,501	0,181	5,164
<b>20050</b>	2,827	0,376	13,299	<b>20774</b>	2,156	0,431	19,982
<b>20054</b>	2,917	0,496	17,021	<b>20775</b>	3,627	0,121	3,333
<b>20058</b>	2,336	0,389	16,665	<b>20778</b>	2,868	0,312	10,870
<b>20059</b>	2,843	0,206	7,232	<b>20786</b>	3,965	0,139	3,507
<b>20066</b>	2,189	0,442	20,204	<b>20787</b>	3,578	0,203	5,680
<b>20070</b>	2,824	0,430	15,227	<b>20793</b>	3,433	0,191	5,568
<b>20071</b>	2,898	0,300	10,344	<b>20801</b>	2,401	0,579	24,097
<b>20073</b>	2,718	0,322	11,848	<b>20804</b>	2,334	0,298	12,757
<b>20075</b>	3,034	0,229	7,540	<b>20831</b>	2,607	0,438	16,795
<b>20076</b>	2,860	0,388	13,559	<b>20832</b>	3,169	0,148	4,661
<b>20077</b>	3,018	0,344	11,412	<b>20835</b>	3,991	0,146	3,651
<b>20078</b>	2,699	0,478	17,724	<b>20840</b>	3,396	0,382	11,259
<b>20083</b>	2,330	0,533	22,878	<b>20845</b>	2,918	0,312	10,679
<b>20088</b>	2,848	0,278	9,756	<b>20850</b>	3,825	0,097	2,544
<b>20138</b>	2,706	0,231	8,536	<b>20871</b>	3,910	0,193	4,947
<b>20141</b>	2,674	0,338	12,636	<b>20885</b>	3,808	0,195	5,118
<b>20148</b>	2,645	0,608	22,996	<b>20886</b>	3,604	0,155	4,299
<b>20150</b>	1,870	0,328	17,521	<b>20898</b>	2,653	0,303	11,415
<b>20152</b>	2,800	0,410	14,654	<b>20901</b>	3,497	0,179	5,121
<b>20154</b>	3,149	0,343	10,879	<b>20919</b>	3,886	0,209	5,375
<b>20161</b>	2,196	0,514	23,387	<b>20952</b>	3,113	0,289	9,280
<b>20162</b>	3,263	0,408	12,492	<b>20959</b>	3,031	0,412	13,579
<b>20164</b>	3,284	0,336	10,222	<b>20966</b>	3,061	0,288	9,407
<b>20184</b>	3,966	0,129	3,250	<b>20970</b>	2,047	0,463	22,626
<b>20192</b>	3,214	0,199	6,191	<b>20981</b>	2,784	0,157	5,628
<b>20194</b>	3,367	0,320	9,509	<b>20984</b>	2,857	0,274	9,596
<b>20199</b>	2,987	0,271	9,072	<b>20996</b>	2,563	0,419	16,364
<b>20200</b>	2,313	0,543	23,485	<b>21086</b>	2,262	0,471	20,833
<b>20203</b>	2,866	0,386	13,482	<b>21102</b>	3,097	0,306	9,889

20208	3,170	0,236	7,446	21105	3,118	0,203	6,517
20217	3,998	0,154	3,856	21123	3,079	0,352	11,433
20218	3,984	0,152	3,806	21174	3,098	0,211	6,817
20258	2,744	0,366	13,328	21202	3,113	0,284	9,110
20259	3,313	0,368	11,108	21217	3,250	0,189	5,817
20263	3,200	0,207	6,463	21303	2,989	0,374	12,497
20267	2,923	0,562	19,236	21306	3,276	0,291	8,887
20275	2,246	0,419	18,639	21337	2,603	0,257	9,863
20345	3,820	0,143	3,752	21340	2,719	0,355	13,054
20347	2,928	0,440	15,019	21342	2,522	0,180	7,121
20348	2,760	0,549	19,896	21366	3,185	0,232	7,272
20351	2,692	0,547	20,319	21389	2,936	0,219	7,451
20353	3,178	0,504	15,848	21401	3,031	0,341	11,258
20356	2,666	0,678	25,432	21611	3,369	0,260	7,721
20358	3,393	0,286	8,424	21764	3,378	0,187	5,522
20366	2,893	0,519	17,944	21790	3,099	0,279	9,017
20368	2,852	0,400	14,022	21807	1,905	0,419	22,002
20370	2,494	0,577	23,120	21823	2,426	0,366	15,092
20377	2,627	0,237	9,021	21881	2,762	0,365	13,210
20380	3,138	0,395	12,581	21888	2,943	0,349	11,873
20381	3,094	0,255	8,243	21902	2,870	0,316	10,992
20387	2,760	0,357	12,949	21917	3,264	0,264	8,089
20389	2,955	0,347	11,740	21918	2,830	0,579	20,456
20393	2,453	0,488	19,888	21985	3,699	0,197	5,314
20395	2,763	0,291	10,546	22064	3,372	0,284	8,408
20396	3,206	0,249	7,760	22066	3,039	0,173	5,676
20400	2,906	0,293	10,096	22076	2,137	0,425	19,878
20406	3,037	0,239	7,871	22086	2,847	0,284	9,960
20407	3,454	0,212	6,136	22093	2,095	0,420	20,066
20408	2,388	0,480	20,099	22103	2,785	0,255	9,169
20412	2,649	0,597	22,535	22140	3,072	0,209	6,801
20415	2,661	0,473	17,778	22153	2,070	0,463	22,373
20419	2,613	0,493	18,863	22200	3,600	0,368	10,219
20421	3,305	0,203	6,132	22232	2,799	0,278	9,926
20426	3,257	0,260	7,992	22283	3,217	0,432	13,429
20439	3,644	0,238	6,531	22302	2,558	0,461	18,006
20441	3,287	0,237	7,207	22305	2,656	0,453	17,049
20448	2,558	0,273	10,676	22311	2,436	0,348	14,299
20450	2,450	0,428	17,465	22321	2,627	0,493	18,753
20453	3,995	0,154	3,866	22332	2,906	0,190	6,532
20457	2,265	0,437	19,276	22335	3,395	0,273	8,038
20458	3,390	0,146	4,297	22400	2,893	0,416	14,366
20501	3,984	0,150	3,771	22402	2,657	0,396	14,919
20544	2,691	0,288	10,708	22414	2,207	0,508	23,009
20547	2,418	0,434	17,958	22419	2,197	0,367	16,699
20561	3,246	0,253	7,784	22429	2,878	0,306	10,636

<b>20569</b>	2,410	0,543	22,526	<b>22476</b>	3,324	0,181	5,435
<b>20572</b>	2,802	0,200	7,150	<b>22487</b>	2,799	0,247	8,832
<b>20578</b>	3,151	0,218	6,906	<b>22488</b>	3,230	0,287	8,888
<b>20585</b>	3,110	0,269	8,650	<b>22493</b>	3,953	0,150	3,797
<b>20590</b>	1,974	0,365	18,501	<b>22502</b>	3,766	0,209	5,538
<b>20593</b>	2,231	0,362	16,244	<b>22571</b>	2,769	0,203	7,343
<b>20598</b>	2,757	0,223	8,100	<b>22596</b>	3,241	0,237	7,316
<b>20610</b>	2,698	0,371	13,761	<b>22601</b>	2,849	0,225	7,899
<b>20613</b>	2,461	0,434	17,637	<b>22604</b>	3,326	0,127	3,819
<b>20624</b>	2,355	0,376	15,965	<b>22623</b>	2,480	0,185	7,442
<b>20626</b>	2,879	0,279	9,675	<b>22634</b>	2,483	0,458	18,444