

Emily Hime Miranda

**Padronização e Validação do teste de Neutralização por Redução
de Placas de Lise em placa de 96 poços para avaliar a
imunogenicidade do componente caxumba da vacina MMR**

Rio de Janeiro
2015

Emily Hime Miranda

Padronização e Validação do teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise em placa de 96 poços para avaliar a imunogenicidade do componente caxumba da vacina MMR

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

Orientador (a): Prof^a. Dr^a.: Erika Martins de Carvalho

Co-orientador (a): Dr^a.: Sheila Maria Barbosa de Lima

Rio de Janeiro

2015

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/
Farmanguinhos/ FIOCRUZ – RJ

M672p

Miranda, Emily Hime

Padronização e Validação do teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise em placa de 96 poços para avaliar a imunogenicidade do componente caxumba da vacina MMR. / Emily Hime Miranda. – Rio de Janeiro, 2015.

xvii, 103f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Erika Martins de Carvalho

Co-orientadora: Dr^a Sheila Maria Barbosa de Lima

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2015.

Bibliografia: f. 109-120

1. Neutralização. 2. Caxumba. 3. Padronização. 4. Validação.
5. Anticorpos. 6. Título.

CDD 614.4

Emily Hime Miranda

Padronização e Validação do teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise em placa de 96 poços para avaliar a imunogenicidade do componente caxumba da vacina MMR

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

Aprovada em: 17/04/2015.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Erika Martins de Carvalho
Instituto de Tecnologia em Fármacos – Fiocruz (Presidente da banca)

Prof^a. Dr^a. Mariana Conceição de Souza
Instituto de Tecnologia em Fármacos - Fiocruz

Prof^a. Dr^a. Waleska Dias Schwarcz
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Fiocruz

Prof^a. Dr^a. Patrícia Cristina da Costa Neves
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Fiocruz

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos Felipe e Melissa, ao meu marido Fernando e a todos os meus familiares que me apoiaram e acompanharam nessa jornada. Dedico também ao meu grupo de amigos e colegas de trabalho que muito me ajudaram a realizar e concluir esta dissertação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por me proporcionar sabedoria, força e me iluminar todos os meus dias;

Ao meu pai e a Sônia, aos meus amados irmãos Juliana e Reinaldo e meus cunhados Fred, Marli, Flávio, Fábio e a minha sogra Neuza, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida;

Ao meu marido Fernando e aos meus filhos Felipe e Melissa, que me acompanharam nessa jornada acadêmica, com paciência e carinho;

À minha querida mãe, que deixou esse plano terrestre para encontrar com Deus a paz tão desejada (muitas saudades);

Às minhas orientadoras Erika e Sheila pelo apoio e ajuda durante todo trabalho, pelo incentivo e palavras de força quando sentia vontade de fraquejar;

Aos Institutos Biomanguinhos e Farmanguinhos, pelo financiamento e suporte técnico-científico. Sinto-me orgulhosa por ter feito parte dessas duas instituições tão importantes à saúde pública brasileira;

À minha antiga chefia Anna Maya por ter permitido que este mestrado fosse realizado;

À minha querida e dedicada equipe PRNT: Stephanie, Vanessa, Ana Carolina, José Henrique, Renata e Marisol, um obrigado não é suficiente para expressar esse sentimento de gratidão!! Agradeço todos os dias por ter amigos como vocês na minha vida!!!!

Aos amigos do LATEV pelo apoio e pelas palavras de conforto que tanto me ajudaram em momentos de nervosismo;

À Kátia pela ajuda com o trabalho e palavras de carinho;

Ao Marlon pela orientação nos cálculos da cinética viral;

Ao Marcelo Ribeiro Alves e Adeilton Pedro de Alcântara pela consultoria e realização das análises estatísticas;

Ao Robson por ajudar na submissão documental do estudo no Comitê de Pesquisa Clínica em seres humanos.

À minha querida turma do mestrado, nosso encontro foi abençoado por Deus!

À secretária Ariane pela dedicação, incentivo e carinho durante todo curso.

Aos professores do mestrado pela competência, comprometimento e amizade.

RESUMO

Hime, Emily Hime Miranda. Padronização e Validação do teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise em placa de 96 poços para avaliar a imunogenicidade do componente caxumba da vacina MMR (sarampo, caxumba e rubéola). 2015.103f. Dissertação. Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015

A caxumba é uma doença infecto-contagiosa imunoprevenível por vacinação. A imunogenicidade vacinal é avaliada através de testes sorológicos que detectam anticorpos neutralizantes, que são considerados correlatos de proteção. O Teste de Neutralização (PRNT) apresenta vantagens frente a outros testes por ser mais específico na detecção desses anticorpos neutralizantes. O presente estudo visou padronizar e validar a técnica. Durante a padronização foram definidos o M.O.I de 0,001 e o melhor dia de pico de vírus infecciosos (3 dias), para definir um protocolo de produção viral. A partir do vírus produzido foram avaliados qualitativamente o fenótipo da placa de lise e a diluição viral em diferentes condições analíticas. Os seguintes parâmetros foram definidos: diluição viral de 1:1600 para obter 30 placas de lise/poço, bicarbonato de sódio como tampão no meio de cultura, meio semi-sólido com carboximetilcelulose (CMC) 1,5%, tempo de adsorção de 3 horas e tempo de incubação final de 4 dias. Para avaliar o impacto do tempo de neutralização na potência viral e no de título de anticorpos neutralizantes, dois intervalos de tempo (1 e 2 horas) foram testados e a neutralização por 2 horas se demonstrou mais adequada ao ensaio. Posteriormente, foi definido um ponto de corte de 23, utilizando um painel sorológico contendo 126 soros pré e pós-vacinais de crianças imunizadas com a vacina tríplice viral. O ponto de corte foi determinado como a área sob a curva ROC usando os resultados de ELISA previamente avaliados em comparados com os resultados de PRNT. Dentre os resultados analisados, 35% foram concordantes na positividade dos resultados em ambos os testes. Valores preditivos positivos de 95,373 e valores negativos 97,680 determinam a real presença ou não da doença. Critérios de aceitação para o teste foram estabelecidos como: faixas de variação do *end point* do vírus (13 a 22) e faixas de variação dos controles (baixo, médio e alto). Também foi estabelecido como as amostras indeterminadas devem ser tratadas. Posteriormente, o PRNT foi submetido ao processo de validação, avaliando os parâmetros de linearidade, especificidade, exatidão e precisão, conforme preconizado pela RDC 27 da ANVISA. Nas análises de precisão foram obtidos coeficientes de variação a 15% para o limite inferior de quantificação do método (LIQ) e 20% para as demais concentrações. O mesmo ocorreu nas análises de exatidão. Quanto a seletividade, não foi detectada reação cruzada nas amostras quando desafiadas com o vírus de sarampo.

Palavras chaves: Neutralização, Caxumba, Padronização, Validação, Anticorpos.

ABSTRACT

Standardization and validation of the Plaque Reduction Neutralization test in 96 well plate to evaluate the immunogenicity of the mumps component of the MMR vaccine (measles, mumps and rubella).

Mumps is an infectious disease preventable by an available vaccine. Vaccine immunogenicity is evaluated by serological tests for detection of neutralizing antibodies, which are considered the correlate of protection. Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) shows advantages for neutralizing antibodies' dosage because of its better specificity when compared to other tests. The present study aims to standardize and validate this technique. During the standardization process, it was defined the multiplicity of infection of 0,001 and the viral peak production on the third day, for defining a viral production protocol. From the virus lot produced, it were qualitatively evaluated the plaque phenotypes and viral dilutions under different analytical conditions. The following parameters were defined: viral dilution of 1:1600 to achieve 30 plaques per well; sodium bicarbonate as buffer of the culture media, semi-solid overlay media content of 1,5% of carboxymethylcellulose (CMC); adsorption time of 3 hours and final incubation of 4 days. In order to evaluate the impact of incubation time for neutralization step on viral potency and neutralizing antibodies' titers, two intervals (1 and 2 hours) were evaluated and the 2-hour neutralization time was considered more appropriate. After that, a cutoff value of 23 was defined using a serological panel containing 126 pre and post- vaccination sera of children immunized with MMR vaccine. The cutoff value was defined from the area under the ROC curve using ELISA data previously analyzed in comparison with PRNT results. Among the results, there were 35% of positive results in agreement in both tests. Positive predictive value of 95.373 and negative predictive value of 97.680 determine the actual presence or absence of disease. Acceptance criteria for the test were established such as: viral endpoint range (13 to 22) and titer variation ranges for control samples (low, medium and high titer). It was also determined how indeterminate samples should be treated. Finally, PRNT were submitted to validation regarding linearity, specificity, accuracy and precision as recommended by RDC 27 of ANVISA. Regarding the precision analyses, coefficient of variations lower than 15% were achieved for the sample with the lower limit of quantification, and lower than 20% for the other sample concentrations tested. The same occurred in the accuracy analyses. Regarding specificity, no cross reaction was detected in the samples when challenged with measles virus.

Key words: Neutralization, Mumps, Standardization, Validation, Antibodies

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE QUADROS	xii
LISTA DE GRÁFICOS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. A Caxumba – Características Gerais	18
1.2. O Agente etiológico	19
1.3. Epidemiologia e Patogênese	24
1.4. Tratamento e Prevenção	26
1.5. Princípios básicos de resposta imunológica para vacinas atenuadas	28
1.6. Avaliação da eficácia vacinal	30
1.7. Padronização e Validação de teste Bioanalítico	32
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo Geral	35
3.2. Objetivos Específicos	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. Vírus	37
4.2. Suspensão celular	37
4.3. Soros amostrais	38
4.4. Soros Padrões	38
4.5. Determinação da Multiplicidade de infecção viral (MOI) para a produção viral 39	
4.5.1. Cinética viral	39
4.5.2. Titulação viral em placas de 24 poços	40
4.5.3. Quantificação de RNA e proteína viral	43
4.5.4. Produção viral	43
4.6. O Teste de Neutralização por Redução de Placa de Lise - PRNT.	44
4.6.1. Quantificação de anticorpos presentes nos soros pelo PRNT estabelecido no laboratório	44
4.6.2. Cálculo para obtenção do título de anticorpos de cada amostra	45
4.7. Padronização da técnica	46
4.7.1. Tipos de tampões	46

4.7.2. Concentração da solução semi-sólida/CMC	47
4.7.3. Definição da condição analítica e da diluição viral pela técnica PRNT	47
4.7.4. Avaliação do período de “neutralização” viral (mimetizando a neutralização)	52
4.7.5. Avaliação do período de 1 e 2 horas de neutralização	53
4.8. Ponto de corte e eficiência do PRNT frente ao teste ELISA	54
4.9. Critérios de aceitação do teste	55
4.9.1. Determinação do valor nominal e dos critérios de aceitação dos padrões	55
4.9.2. Critérios de aceitação do controle de vírus	56
4.10. Validação	56
4.10.1. Curva de calibração	56
4.10.2. Precisão Intracorrída e intercorrída	59
4.10.3. Exatidão Intracorrída e Intercorrída	60
4.10.4. Seletividade (especificidade).....	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1. Cinética viral	62
5.2. Quantificação de RNA e proteína viral	64
5.3. Avaliação das diferentes condições analíticas testadas na padronização do teste	66
5.3.1. Determinação do tempo de incubação final	67
5.3.2. Determinação do tempo de adsorção	71
5.3.3. Definição da condição analítica para o teste	76
5.3.4. Avaliação do período de incubação viral e determinação da diluição viral	80
5.3.5. Análise da interferência dos intervalos de neutralização de 1 e 2 horas na ligação vírus-anticorpo	83
5.4. Determinação do Ponto de corte para o teste	86
5.5. Critérios de aceitação do teste	94
5.5.1. Determinação dos critérios de aceitação e valor nominal dos padrões	94
5.5.2. Critérios de aceitação para o controle viral	96
5.6. Validação	98
5.6.1. Curva de calibração	98
5.6.2. Precisão e exatidão	101
5.6.3. Seletividade	103
6. CONCLUSÃO	106
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	109

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Foto de um menino apresentando em ambos os lados do pescoço, o inchaço das glândulas salivares, que são sintomas clássicos da doença.....	18
Figura 2 -	Esquema representativo da estrutura geral de um vírus pertencente à família Paramyxoviridae.....	20
Figura 3 -	Esquema representativo do genoma do MuV.....	21
Figura 4 -	Esquema representativo do ciclo replicativo viral dos paramyxovírus.....	23
Figura 5 -	Sequência ilustrativa da diluição viral realizada na placa de 24 poços.....	41
Figura 6 -	Esquema de distribuição dos inóculos na placa de 24 poços com monocamada celular pré-formada.....	42
Figura 7 -	Desenho esquemático do teste em placa de 96 poços.....	45
Figura 8 -	Esquema de diluição da seriada do vírus numa placa de 96 poços.....	48
Figura 9 -	Esquema de distribuição das três suspensões virais na placa de 96 poços para avaliar o tempo de incubação viral.....	52
Figura 10 -	Diluição seriada do soro SIH 161 para a realização da curva de calibração.....	57
Figura 11 -	Distribuição das amostras de soro nas placas de 96 poços para a obtenção da curva de calibração.....	59
Figura 12 -	Distribuição dos soros na placa de 96 poços para verificar a especificidade.....	61
Figura 13 -	Análise de correlação linear de RNA e Proteína de cada garrafa.....	64
Figura 14 -	Determinação do tempo de incubação final com o 2º diluente.....	68
Figura 15 -	Determinação do tempo de incubação final com o 1º diluente.....	70
Figura 16 -	Determinação do tempo de adsorção com o 2º diluente.....	72
Figura 17 -	Determinação do tempo de adsorção com o 1º diluente.....	74
Figura 18 -	Determinação do tempo de adsorção com 1º e 2º diluente.....	75
Figura 19 -	Comparação entre as diferentes condições analíticas.....	78
Figura 20 -	Determinação da faixa de diluição do vírus.....	79
Figura 21 -	Comparação entre 1 e 2 horas de incubação de cada suspensão viral.....	82

Figura 22 - Fluxograma de interpretação do resultado do ensaio de PRNT para caxumba.....	93
Figura 23 - Determinação do valor nominal de cada soro padrão.....	94
Figura 24 - Resultados dos ensaios para avaliar a especificidade do PRNT para caxumba e sarampo.....	103

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Proteínas do vírus caxumba e suas funções.....	22
Quadro 2 -	Concentração do MOI utilizado na cinética viral.....	40
Quadro 3 -	Representação esquemática das condições analíticas avaliadas nos moldes do ensaio de PRNT.....	50
Quadro 4 -	Representação esquemática das condições analíticas executadas nos 4 ensaios variando o tempo de incubação final.....	51
Quadro 5 -	Seleção da condição analítica do teste (2º diluente/HEPES), 1 N., 3 ADS., a partir do tempo de incubação final	67
Quadro 6 -	Seleção da condição analítica do teste (1º diluente/Bicarbonato de sódio), 1 N., 3 ADS., a partir do tempo de incubação final	69
Quadro 7 -	Seleção da condição analítica do teste a partir do tempo de adsorção de 5 horas com 2º diluente.....	71
Quadro 8 -	Seleção da condição analítica do teste a partir do tempo de adsorção de 5 horas com o 1º diluente.....	73
Quadro 9 -	Seleção da condição analítica do teste a partir do tempo de adsorção de 24 horas com o 1º e 2º diluente.....	75
Quadro10 -	Diferentes condições analíticas do teste a partir do tempo de incubação de 4 dias com os 2 diluentes.....	77
Quadro11 -	Base de dados para a determinação da diluição viral.....	83
Quadro12 -	Títulos observados de cada amostra (diluição do soro SIH161) nas três curvas de calibração.....	99
Quadro13 -	Definição do valor nominal de cada concentração da curva.....	100
Quadro14 -	Dados compilados da curva de calibração, precisão e exatidão do teste.....	102

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Análise do perfil cinético do vírus da caxumba.....	63
Gráfico 2 - Avaliação do intervalo de tempo de neutralização do soro padrão positivo.....	84
Gráfico 3 - Curva ROC construída com 126 soros testados por PRNT e ELISA.....	87
Gráfico 4 - Representação dos resultados concordantes e discordantes dos dois testes.....	90
Gráfico 5 - Histograma de frequência absoluta de todos os controles virais dos ensaios realizados.....	97
Gráfico 6 - Linearidade das três curvas de calibração.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Maiores Manifestações causadas pelo MuV.....	25
Tabela 2 - Título viral de todas as garrafas (A, B, C, D, E, F) referente ao segundo dia de DPI.....	63
Tabela 3 - Análise da curva ROC na performance do PRNT na detecção de anticorpos neutralizantes para caxumba.....	88
Tabela 4 - Tabela comparativa dos 126 resultados analisados de ambos os testes...	89
Tabela 5 - Valores preditivo positivos e negativos do PRNT.....	90
Tabela 6 - Classificação dos títulos de anticorpos em positivo e negativo no teste....	92
Tabela 7 - Variações obtidas de cada soro padrão avaliado.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C - antes de Cristo

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASCLIM - Assessoria Clínica em Imunobiológicos

ATCC - American Type Culture Collection

AUC - Área sob a curva

BOD - Biochemical Oxygen Demand

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CAAE – Certificado de Apresentação para a apreciação Ética

CDC - *Centers for Diseases Control and Prevention*

CMC - *Carboximetilcellulose sodium salt*

CQA - Controle de qualidade de alta concentração do analito

CQB - Controle de qualidade de baixa concentração do analito

CQD - Controle de qualidade de diluição de mais alta concentração do analito em relação ao CQA

CQM - Controle de qualidade de média concentração do analito

CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica

CV - Coeficiente de variação

CVI - Controle viral

DPI – Dias pós-infecção

ERP - Erro padrão relativo

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

F - Proteína de fusão

GSK - GlaxoSmithKline

HI - Inibição da Hemaglutinação

HN - Hemaglutinina/Neuroaminidase

ICH - Harmonised Tripartite Guideline

IEC - Internacional Electrotechnical Commission

IFA - Imunofluorescência

IFI - Imunofluorescência indireta

IgA - Imunoglobulina A

IgD - Imunoglobulina D

IgE - Imunoglobulina E

IgG - Imunoglobulina G
IgM - Imunoglobulina M
I - Proteína não estrutural
ISO - International Organization for Standardization
L - Proteína grande
LAEAN – Laboratório de Experimentação Animal
LATEV - Laboratório de Tecnologia Viroológica
LIQ - limite inferior menor quantificação do analito
M - Proteína de membrana
MA - Média aritmética
MHC – Complexo de Histocompatibilidade principal
MOI - Multiplicidade de Infecção
MuV - Vírus da caxumba
N - Nucleotídeo
nm - Nanometro
pH - potencial de Hidrogênio
NP - Nucleoproteína
P - Fosfoproteína
UFP - Unidade formadora de placas de lise
PRNT - *Plaque Reduction Neutralization Test*
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada
RNA - Ribonucleic Acid
ROC - *Receiver Operating Characteristic*
RPM - rotações por minuto
SH - Proteína hidrofóbica pequena
SFB - Soro fetal bovino
SIH - Soro *in house*
SMS - Secretaria municipal de saúde
SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde
t - teste t de student
UFP - Unidade formadora de plaque de lise
UK - *United Kingdom*
V - Proteína não estrutural
VDTEC - Vice Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico
VDR - *Virus reference department*

VERO - células de Rim de Macaco Verde africano

WHO - *World Health Organization*

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Caxumba – Características Gerais

A parotidite infecciosa, popularmente chamada de papeira, é uma doença infecto contagiosa, auto limitada, comum na infância, podendo acometer também a jovens adultos (SVS, 2013a; CDC, 2011). Apresenta como característica principal a inflamação aguda das glândulas parótidas, manifestando-se de forma unilateral ou bilateral (Figura 1), podendo atingir também as glândulas sublinguais ou submandibulares, com duração mínima de 2 dias, sem outra causa aparente (SVS, 2013a; Santos *et al.*, 2008).



Figura 1: Foto de um menino apresentando em ambos os lados do pescoço o inchaço das glândulas salivares, que são sintomas clássicos da doença. Extraído do site <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=130> Acesso em: 27/01/2015.

A trajetória histórica da caxumba revela ser esta uma doença conhecida há mais de dois milênios. Hipócrates, no século V a.C, foi o primeiro a descrever clinicamente a doença. No final do século XVIII, Robert Hamilton observou a prevalência de orquite (inflamação dos testículos) em pacientes com caxumba, mas foi somente em 1934

que os pioneiros Johnson e Goodpasture caracterizaram a caxumba como um agente etiológico viral, e como sendo um agente filtrável. Em 1945, Habel e Enders isolaram o vírus pelo método de inoculação em ovos embrionados, comprovando a sua capacidade hemaglutinante, hemolisante e neuraminidásica (Santos *et al.*, 2008). Em 1958 surgiu a primeira vacina de vírus vivo atenuado. Nesta vacina, o vírus foi submetido a sucessivas passagens em substratos celulares para a redução de sua virulência, sem afetar a sua capacidade infectante (Santos *et al.*, 2008; Graham & Crowe, 2007).

1.2. O Agente etiológico

O vírus da Caxumba (MuV) pertence a ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, gênero *Rubulavirus* (Santos *et al.*, 2008; Carbone & Rubin, 2007; Chang A & Dutch R. E., 2012). A partícula viral é esférica e mede de 100 a 300 nm, sendo constituída de um capsídeo pleomórfico, de simetria helicoidal, (Santos *et al.*, 2008). A figura 2 representa a estrutura geral dos vírus da família *Paramyxoviridae*.

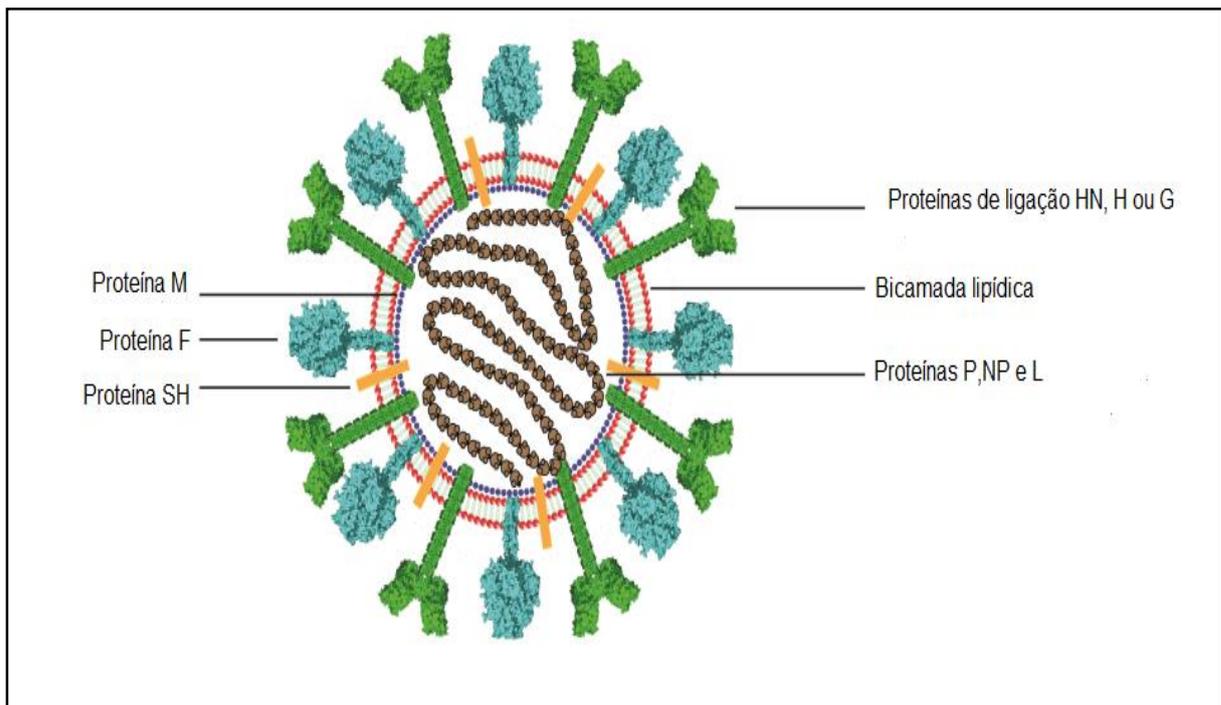


Figura 2 - Esquema representativo da estrutura geral de um vírus pertencente à família *Paramyxoviridae*. O RNA genômico é enovelado pelas proteínas P (fosfoproteína), NP (nucleopsideo) e L (proteína grande). As proteínas HN (Hemaglutinina/neuraminidase), H (hemaglutinina) e G (Glicoproteína) são proteínas responsáveis pela ligação do vírus no ácido sialico da célula (verde). Os mesmos estão ancorados na parte externa da proteína M (proteína de membrana) (azul). A proteína SH (hidrofóbica pequena) presente apenas em certos paramixovírus (laranja). A proteína F (proteína de fusão) (cinza) e o envelope viral (bicamada lipídica) (vermelha). Extraído e adaptado de Chang A & Dutch R. E., 2012.

O genoma do MuV é formado por uma fita simples de RNA linear, não segmentado, de polaridade negativa, que apresenta 15.384 nucleotídeos que codificam as seguintes proteínas: nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P), proteína V (P/V), proteína de membrana (M), proteína de fusão (F), proteína hidrofóbica pequena (SH), hemaglutinina/neuroaminidase (HN) e proteína grande (L) (Figura 3) (Elango *et al.* 1988). O MuV apresenta apenas um sorotipo, porém doze genótipos estão descritos com base no sequenciamento dos genes HN e SH (Jin L. *et al.*, 2005; Jin L. *et al.*, 2014; Carbone & Rubin, 2007; Santos C. L. *et al.*, 2008). O quadro 1 descreve de forma resumida as funções das proteínas.

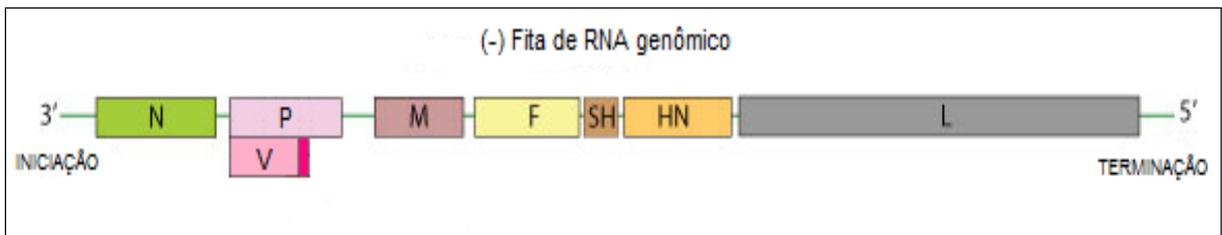


Figura 3 - Esquema representativo modificado do genoma do MuV. As proteínas codificadas são: N: Nucleoproteína; P/V: Fosfoproteína/Proteína V; M: Proteína de Membrana, F: Proteína de Fusão; SH: Proteína Hidrofóbica pequena; HN: Hemaglutinina/Neuraminidase; L: Proteína Grande. Extraído do site: http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/88.html Acesso em: 27/01/2015.

Quadro 1 - Proteínas do vírus Caxumba e suas funções

PROTEÍNAS	FUNÇÃO
Nucleoproteína (NP)	Formação do núcleocapsídeo. Serve como antígeno nos ensaios de detecção de IgM.
Fosfoproteína (P)	Síntese de RNA, quando associado a L (P-L) atua como polimerase, quando associado a NP (P-NP) atua no encapsulamento do RNA viral. Dá origem a V após processamento.
Proteína (V)	Proteína não estrutural codificada pelo gene da proteína P, e que está envolvida na inibição da resposta antiviral da célula
Proteína de Membrana (M)	Participa da montagem e brotamento da partícula viral
Proteína de Fusão (F)	Participa da fusão da membrana do vírus com a membrana da célula hospedeira
Proteína Hidrofóbica pequena (SH)	Proteína altamente variável, sua sequência é empregada na genotipagem do vírus, como também na inibição de resposta antiviral da célula.
Hemaglutinina/Neuroamienidase (HN)	Glicoproteínas de fusão e adsorção, atividade hemaglutinante e neuroaminidase
Proteína Grande (L)	Polipeptídeo de alto peso molecular e faz parte do complexo polimerase.

O ciclo replicativo do vírus da caxumba (figura 4) se dá pela fusão direta e adsorção das proteínas F e HN com a membrana da célula hospedeira. A proteína F também é a responsável pela fusão da membrana de célula-a-célula, facilitando a propagação viral (Chang A. & Ductch R. E., 2012; Rubin S. *et al.*, 2014). No caso das glicoproteínas HN, estas se ligam aos receptores de ácido siálico presentes na parte externa da membrana celular. Após o reconhecimento, ocorre uma mudança no estado conformacional destas proteínas, propiciando a internalização da partícula viral na célula hospedeira (Chang A. & Ductch R. E., 2012). Uma vez internalizado, ocorre a liberação do RNA no citoplasma para a sua transcrição em RNA mensageiro. O evento é mediado pela RNA-polimerase-RNA dependente viral, que forma um complexo com a proteína P e a proteína L. A proteína P é codificada pelo gene P que

possui a capacidade de processar as proteínas não estruturais V e I (Elliott *et al.*, 1990). O gene L, codifica uma poliproteína de alto peso molecular. Após a tradução dos RNAs em proteínas virais, o evento seguinte é a replicação do genoma viral em RNAs genômicos de polaridade negativa. A proteína NP é responsável pelo encapsulamento desses RNAs genômicos.

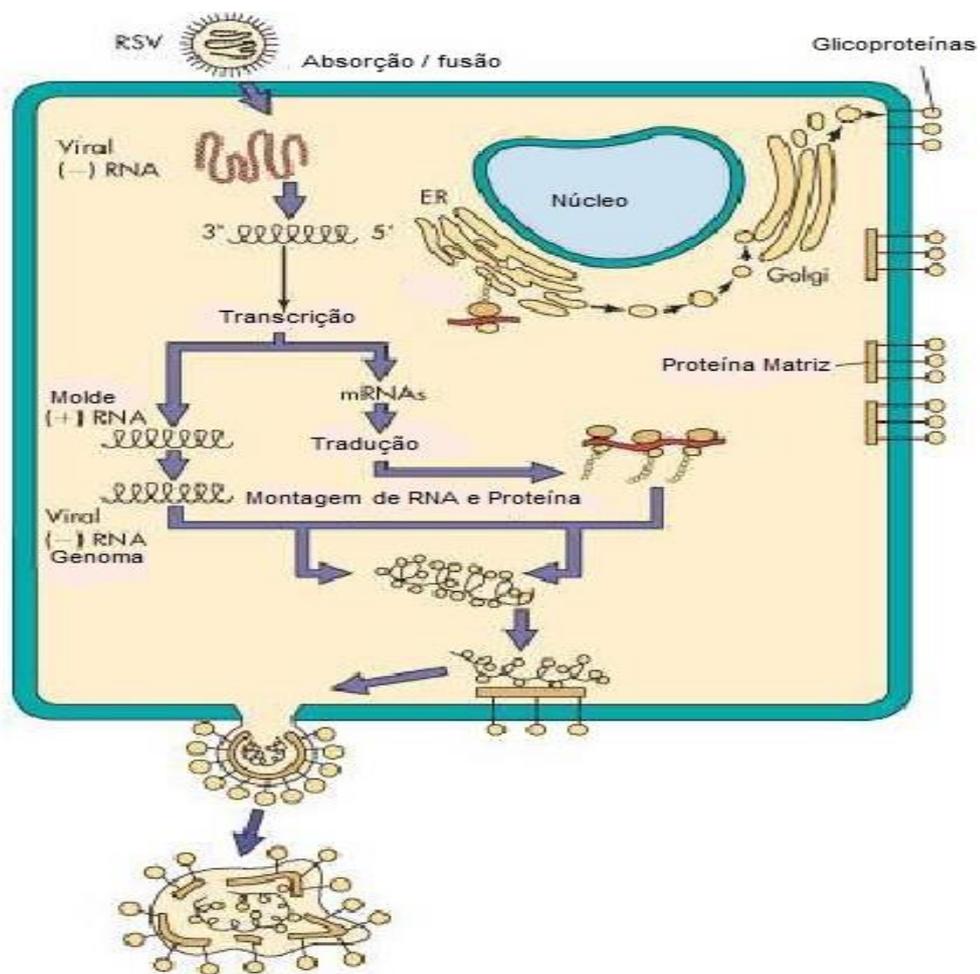


Figura 4 - Esquema representativo do ciclo replicativo viral dos *Paramyxovirus*. Extraído e adaptado de Balows A, *et al.*: Laboratory diagnosis of infectious diseases: principles and practice New York, 1988, Springer – Verlag.

O vírus tem sua estrutura totalmente montada no retículo endoplasmático. As glicoproteínas virais SH, HN e F também são sintetizadas no retículo endoplasmático e encaminhadas para o complexo de Golgi, onde são posteriormente transportadas e ancoradas na parte externa da membrana celular com auxílio da proteína M.

Posteriormente, o RNA genômico ao sair da célula pelo processo de brotamento, carrega estas glicoproteínas e a partícula viral completa é formada (Harrison M.S., Sakaguchi T. & Schmitt, 2010; Liljeros L. & Butcher S. J., 2013).

1.3. Epidemiologia e Patogênese

A Caxumba tem distribuição mundial (WHO, 2013b) e em alguns países, a alta incidência ocorre com altos picos epidêmicos entre 2 a 5 anos, afetando em sua maioria crianças com idades de 5 a 9 anos, conferindo assim, uma proteção imunológica definitiva (Galazka, 1999; WHO 2013a). A doença pode ocorrer também em jovens adultos (WHO, 2013a).

Com incidência anual entre 100-1000 casos/100000 habitantes, a doença em regiões onde o clima é quente ocorre em todo o período do ano. Por outro lado, em regiões de clima temperado o pico de incidência ocorre no final do inverno (WHO 2007).

Dados históricos relatam que a disseminação do patógeno ocorria com maior prevalência em ambientes confinados, como por exemplo: prisões, orfanatos, internatos, navios e quartéis militares (Hirsch A. *apud* Galazka *et al.*, 1999).

O ser humano é o único hospedeiro natural conhecido (Galazka *et al.*; 1999; CVE, 2001). A doença possui alta transmissibilidade, e acontece por contato direto com secreções respiratórias provenientes de espirros e tosse e pelo uso compartilhado de talheres ou de objetos que tenham sido utilizados pela pessoa infectada. Por esta razão, segundo o *Centers for Diseases Control and Prevention – CDC*, recomenda-se o isolamento do infectado por 5 dias, quando as glândulas salivares começarem a inchar (CDC, 2010a).

O tempo de incubação do vírus da caxumba é em média entre 12 a 25 dias. Após esse período, surgem os sintomas associados à doença (CDC, 2010a), que se iniciam com mialgia, cefaléia, mal estar geral e febril, que ocorrem antes do aparecimento do edema nas glândulas parótidas, podendo se apresentar de forma unilateral ou bilateral (Hviid A., Rubin S. & Muhlemann, 2008; Snow M. *et al.*, 2006).

Geralmente a doença evolui de forma benigna, sem deixar sequelas, e em alguns casos, pode decorrer assintomaticamente (CVE, 2001). A doença pode também transcorrer para a severidade, com o vírus disseminando-se para outros

órgãos do corpo, causando complicações, com maior probabilidade de ocorrências em jovens adultos (CDC, 2010b; WHO, 2013a). A tabela abaixo resume as manifestações provocadas pelo vírus, bem como sua frequência.

Tabela 1 – Maiores manifestações causadas pelo MuV. Fonte: Extraído e Adaptado de Falk *et al.*, 1989.

MANIFESTAÇÃO	FREQUÊNCIA (%)
GLÂNDULA	
Parótida	60-70%
Submandibular ou sublingual	10%
Epidídimo-orquite	25%
Ooforite	5%
Pancreatite	4%
NEUROLÓGICA	
Pleocitose assintomática do fluido cérebro espinhal	50%
Meningite asséptica	1-10%
Encefalite	0.02-0.3%
Perda auditiva (usualmente transiente)	4%
OUTROS	
Anormalidades brandas da função renal	30-60%

1.4. Tratamento e Prevenção

Atualmente não existe tratamento para a doença, pessoas acometidas fazem repouso e uso de analgésicos para controle dos sintomas, além do acompanhamento do quadro clínico para a observação de possíveis complicações (SVS, 2013b). O único mecanismo de prevenção é através do uso da vacina, que é ofertada pelo setor público como a tríplice viral. A mesma tem o propósito de atender à demanda de saúde pública, de acordo com o esquema preconizado pelo Ministério da Saúde e Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS, 2013b).

Em 2002, a vacina para caxumba foi incluída no calendário de imunização de 121 países/territórios. Em países onde a vacinação foi iniciada, com uma ampla cobertura, a incidência da doença caiu extremamente e a sua circulação foi interrompida. Em países onde a vacinação não foi introduzida, a incidência de caxumba continua elevada, afetando principalmente crianças (WHO, 2013b). Apesar da efetividade da cobertura vacinal, alguns países evidenciaram através de estudos epidemiológicos, casos da doença, como por exemplo: EUA, Reino Unido, Canadá e Moldávia, que poderiam estar relacionados ao genótipo G do vírus (Agência de Saúde Públcido Canadá, 2007; Savage *et al.*, 2005.; Bernard *et al.*, 2008; Gouma S., 2014). Dados da literatura retratam que embora os anticorpos induzidos pela cepa vacinal *JerylLynn* (JL) de genótipo A neutralizem cepas do genótipo G, diferenças no título de anticorpos foram observadas quando os soros foram coletados durante um surto epidêmico e avaliados com o genótipo selvagem do tipo G e A (Rubin *et al.*, 2008). Diante dessas observações, estudos recentes mostraram que apesar da variabilidade genética do vírus, a cepa *Jeryl Lynn* é capaz de induzir anticorpos neutralizantes que abrangem todas as variações genotípicas do vírus (Rubin S. A. *et al.*, 2012). A hipótese atribuída aos surtos aonde houve cobertura vacinal, retrata a queda dos níveis de anticorpos ao longo dos anos conforme o avanço da idade dos vacinados (Barskey, A. E. *et al.*, 2012; Rubin S. A. *et al.*, 2012), permitindo que estes possam se tornar novamente susceptíveis a doença. Essa especulação incitou propostas voltadas para o aumento do número de doses da vacina, ou seja, alguns países adotam não somente a segunda dose como é realizado mundialmente, mas também a terceira dose da vacina, em casos de surtos da doença (Ogbuanu I. U., 2012).

Com isso, gerou-se preocupações a nível mundial quanto à saúde pública, dando repercussão a estudos epidemiológicos mais criteriosos, de modo à avaliar não

somente o impacto da efetividade e eficácia vacinal, como também das estratégias de prevenção, avaliando a possibilidade do aumento do número de doses em coberturas vacinais e da mudança da faixa etária para a administração das doses de reforço (Ogbuanu I. U., 2012).

No Brasil, não existe uma notificação compulsória nos casos decorrentes de caxumba (SVS, 2013a; CVE 2001). Porém, na ocorrência de surtos epidêmicos, deve-se proceder com a notificação dos casos, como medida de controle e conhecimento do curso da doença (CVE, 2001; SVS, 2013b).

A inserção da vacina tríplice viral no Brasil foi gradativa, e de acordo com o Ministério da Saúde, ocorreu de 1992 a 2002. No Estado de São Paulo, onde a vacina foi inserida na rotina em 1992, houve um impacto positivo no declínio da doença, sendo observada a diminuição de casos de meningite, cujo coeficiente anual caiu de 3,28 casos por 100.000 habitantes em 1991 para 0,02 casos por 100.000 habitantes em 1993 (CVE, 2001).

No ano de 2004, em todo território nacional, deu-se continuidade a campanha de vacinação contra sarampo, caxumba e rubéola para crianças de doze meses a quatro anos, na qual foram vacinadas 12.777.709 crianças, obtendo-se 92.80% de cobertura vacinal. (SVS, 2013b).

A vacina atual ofertada pelo setor público é a trivalente atenuada, composta por sarampo, caxumba e rubéola, contendo as cepas Shwarz measles, RIT 4385 mumps (derivada da cepa de caxumba Jeryl Lynn) e a Wistar RA 27/3, respectivamente (Wellington & Goa, 2003).

Em agosto de 2012, foi assinado um contrato aditivo de transferência de tecnologia entre o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/Biomanguinhos e a GlaxoSmithKline/GSK, que propôs mudanças tecnológicas em todo o processo de formulação e fabricação da vacina (Biomanguinhos, 2013). Essa transferência propiciará estudos futuros para avaliar o perfil epidemiológico de coberturas vacinais que garantam a segurança e eficácia do produto.

1.5. Princípios básicos de resposta imunológica para vacinas atenuadas

Objetivamente, o princípio básico da vacinação é induzir no organismo uma resposta efetiva de combate ao patógeno quando esse organismo é exposto pela segunda vez, evitando o desenvolvimento da doença e gerando uma proteção individual. Outro objetivo proposto é obter uma cobertura populacional que impeça a disseminação do patógeno ou até mesmo que promova sua total erradicação, proporcionando uma proteção coletiva (Schatzmayr, 2003).

A vacina é capaz de envolver mecanismos de resposta imunológica no organismo que ativam todo um complexo de elementos que irão atuar diretamente no antígeno (Schatzmayr, 2003).

A vacina viral atenuada envolve vírus vivo que mantém sua capacidade de infecção, mas que não é capaz de desenvolver a doença (Baxter, D., 2007). Após a vacinação, sob o ponto de vista geral, os vírus atenuados são fagocitados pelas células profissionais ou células apresentadoras de antígeno, onde suas proteínas sofrem degradação proteolítica. Esses peptídeos proteicos são transportados à superfície e dispostos nas glicoproteínas MHC do tipo II, onde serão reconhecidos pelos linfócitos T (CD4+). Esses linfócitos possuem duas categorias funcionais: T helper 1 e T helper 2. A T helper 1 está relacionada a estimulação de células fagocíticas, enquanto que a T helper 2 ativa e estimula a expansão clonal dos linfócitos B, que passam a ser diferenciados em células plasmáticas. Estas por sua vez, secretam anticorpos neutralizantes específicos para determinado antígeno, levando a uma imunidade humoral (Janeway Charles A., 2002).

Os anticorpos são imunoglobulinas heterodiméricas compostas de duas cadeias pesadas e duas leves. Estas cadeias estão dispostas espacialmente de forma representativa como a letra Y. Cada cadeia leve está conectada a uma cadeia pesada, e as duas pesadas estão conectadas por pontes de dissulfeto. Uma cadeia leve é composta por um domínio V de variável e um C de constante, enquanto que a cadeia pesada pode possuir um domínio V e de três a quatro domínios C. De acordo com as diferenças nessas regiões constantes das cadeias pesadas, os anticorpos são classificados em: IgA; IgM; IgE; IgD; IgG e subclasses (IgA1, IgA2; IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) (Schroeder Jr H. W. & Cavacini L., 2010).

As imunoglobulinas IgG e IgE são secretadas como monômeros, as imunoglobulinas IgA como dímeros e as imunoglobulinas IgM são secretadas como

pentâmeros, e podem estar acoplados no linfócito B sendo receptores antigênicos. No caso específico das imunoglobulinas IgD, estas não são secretadas, formam somente receptores antigênicos do linfócito B maduro (Abbas, 2008). O mecanismo de ação efetora das imunoglobulinas consiste na ativação do sistema complemento, na ativação e potencialização da atividade fagocítica de células efectoras (opsonização) e na atuação direta ao antígeno, neutralizando-o (Schroeder Jr H. W. & Cavacini L., 2010).

A imunoglobulina G (IgG) é a mais abundante imunoglobulina presente no soro, representando em torno de 10% a 20% das proteínas do plasma humano (Virdarsson G. Dekkers G & Rispen T., 2014). De acordo com as diferenças estruturais na região constante da cadeia pesada C_H 1 e C_H 3, designa-se as quatro subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), sendo estas classificadas por ordem crescente de predominância no organismo (Virdarsson G. Dekkers G & Rispen T., 2014). Todas atuam na neutralização de vírus e toxinas, na mediação por sistema de citotoxicidade celular, no transporte transplacentário e na resposta imune secundária. Em contrapartida, podem desempenhar atividades funcionais distintas, como por exemplo, IgG1, IgG2 e IgG3 (exceto IgG4), atuam na ativação da via clássica do sistema complemento. IgG1, IgG3 e IgG4 são predominantes nas respostas decorrentes a antígenos proteicos solúveis e de membrana, enquanto IgG2 prevalece em respostas a antígenos polissacarídeos encapsulados de bactéria.

A IgG é produzida posteriormente à fase de infecção inicial do patógeno, demonstrando uma maior afinidade com o epítipo. Sua permanência é prolongada no organismo, ou seja, permanece circulante no organismo por toda a vida, conferindo assim uma imunidade protetora duradoura (Imrie A., 2007).

Em termos de neutralização, algumas dessas IgGs desempenham o papel de neutralizar a ação do vírus no processo inicial de entrada na célula hospedeira (Dowd K. A., 2011). São, portanto, denominados anticorpos neutralizantes por reconhecer epítopos específicos de ligação do vírus relacionados diretamente com a entrada na célula hospedeira, impedindo dessa forma a sua internalização. Nesse processo de intervenção, os mesmos podem se conectar na etapa inicial do processo de replicação viral bloqueando o sítio alvo de reconhecimento do vírus na célula, como também na ligação do sítio alvo de fusão, bloqueando a etapa de fusão do vírus com a membrana plasmática (Wahala M. P. B., 2011).

1.6. Avaliação da eficácia vacinal

A eficácia vacinal está diretamente relacionada à resposta imunológica de um indivíduo após a aplicação da vacina (Schatzmayr, 2003). O diagnóstico virológico permite detectar, quantificar e caracterizar estas respostas imunológicas e nas últimas décadas se transformou numa importante ferramenta para a medicina e para a saúde pública (Santos & Benati, 2008).

Os primeiros métodos usados amplamente no diagnóstico virológico foram os métodos sorológicos, tais como: Teste imunoenzimático, Teste de aglutinação, Teste de imunofluorescência, Teste de neutralização, Teste de inibição da hemaglutinação, Teste de fixação do complemento e Imunoperoxidase (Santos & Benati, 2008). Ao longo dos anos, alguns destes deixaram de ser empregados rotineiramente, embora apresentem vantagens e desvantagens quanto a sua utilização para a obtenção de uma resposta.

O teste de inibição da Hemaglutinação (HI) – tem por princípio a hemaglutinação de hemácias (obtidas de animais) (Pipkin, 1999; Santos & Benati, 2008). O teste analisa apenas anticorpos totais, não distinguindo IgG de IgM. Apresenta baixa sensibilidade e especificidade (Albrecht *et al.*, 1981). Para caxumba, os anticorpos fazem reação cruzada com os vírus: parainfluenza, Esptein- Barr, adenovírus e vírus do Herpes humano (CDC, 2012). Além disso, faz-se necessário a utilização de animais para a obtenção de sangue. O Instituto Adolfo Lutz utiliza esse teste no propósito de identificar casos suspeitos de infecção por caxumba (CVE, 2005).

O teste de imunofluorescência indireta (IFI) - utiliza-se de anticorpos marcados (conjugados) com corantes fluorescentes para revelar a formação de imunocomplexos, ou seja, vírus-anticorpo. O teste pode identificar os anticorpos IgG e IgM (Santos & Benati, 2008). Sua utilização é voltada para a detecção de IgM, no entanto, pode sofrer interferência de anticorpos IgG (especialmente de pessoas que tem histórico de vacinação). Além disso, quanto à análise de IgG, o mesmo não evidencia a sua funcionalidade. Portanto, este teste apresenta pouca sensibilidade e especificidade na determinação de anticorpos neutralizantes, como também, na reação cruzada a outros agentes etiológicos (CDC, 2012).

O teste de Fixação de complemento (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) (Santos & Benati, 2008). No caso de caxumba,

não há muitos registros literários a respeito, mas quanto a sua utilização para outros antígenos virais, como por exemplo, o sarampo, o teste FC é tão baixa quanto o HI (Albrecht *et al.*, 1981). O mesmo utiliza sangue e a sua obtenção envolve o uso de animais.

Em relação a caxumba, os testes sorológicos mais descritos na literatura são: o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o Teste de neutralização (PRNT).

O ELISA é uma reação imunoenzimática para identificação de antígenos ou de anticorpos. É um teste utilizado como uma abordagem rápida de obtenção de uma resposta mediante uma suspeita de infecção aguda ou mesmo podendo ser utilizado para triagem (CDC, 2012). Suas limitações consistem em apresentar resultados falsos negativos, muito provavelmente por causa da inabilidade de detecção de anticorpos presentes em baixos níveis no soro (Mauldin *et al.*, 2005). Além disto, apresenta alta sensibilidade, detectando todos os anticorpos que reagem ao antígeno, não possuindo a capacidade de distinguir anticorpos neutralizantes de não neutralizantes (CDC, 2012; Mauldin *et al.*, 2005; Tischer A. *et al.*, 2007). Podem apresentar reação cruzada, ou seja, anticorpos específicos de outros agentes etiológicos podem se ligar aos antígenos do vírus da caxumba, devido à similaridade da Hemaglutinina e Neuramidase presentes na superfície do envelope viral de diversos vírus, como por exemplo: parainfluenza, Epstein-Barr, adenovírus e vírus do Herpes humano (CDC, 2012; P. A. Pipkin *et al.*, 1999; Mauldin *et al.*, 2005).

O teste de neutralização (PRNT) está fundamentado no princípio de ligação antígeno e anticorpo, dando mais ênfase na atividade biológica do anticorpo. Deste modo, determina um parâmetro biológico de verificação de neutralização viral *in vitro* (Simões, 2011). Estes anticorpos são considerados correlatos de proteção e os mesmos podem ser bons indicadores biológicos de eficácia vacinal (Mauldin *et al.*, 2005; Cohen *et al.*, 2007).

Amplamente utilizado no Laboratório de Tecnologia Viroológica/LATEV, sua aplicação é direcionada para a pesquisa de anticorpos específicos de diversos antígenos virais, como por exemplo: febre amarela, dengue e sarampo. Podem ser realizados em placas de 6, 24 ou 96 poços (Cohen *et al.*, 2007; Simões, 2011; Roehrig J. T., Hombach J. & Barrett A. D.T., 2008).

De forma geral, o teste de neutralização está compreendido em quatro etapas de execução: 1º- preparação das amostras e adição de vírus na placa; 2º- adição de células; 3º- adição de solução semi-sólida; 4º- fixação e coloração do teste após o

período de incubação, que pode variar de 5 a 7 dias (Cohen *et al.*, 2007; Simões, 2011).

Em especial, o teste executado na placa de 96 poços (a descrição detalhada do protocolo está redigida na metodologia), apresenta vantagens, pois avalia um maior número de amostras, favorecendo o atendimento em menor escala de tempo às demandas dos Estudos Clínicos. Além disso, impacta positivamente na redução de materiais e insumos utilizados na realização de cada ensaio, representando um aspecto econômico favorável. No entanto, o PRNT apresenta algumas desvantagens, como variabilidade e morosidade na obtenção dos resultados (em torno de 6 a 7 dias) (Cohen *et al.*, 2007; Simões, 2011). Além disso, não existe critérios de controle do processo que garantam qualidade na medição das respostas sorológicas, um ponto de corte e o conhecimento da eficiência e eficácia do mesmo. Diante desta afirmativa, a padronização e a validação se fazem necessários, por atribuir melhoria na eficiência, rapidez e qualidade na técnica.

1.7. Padronização e Validação de teste Bioanalítico

O desenvolvimento e a padronização de uma técnica implicam em alterações no processo que impactam positivamente na qualidade dos resultados obtidos (Oliveira, A. R. R., 2009; Timiryasova T.M.*et al.*, 2013). Portanto, a análise de cada uma das etapas envolvidas no processo da técnica de neutralização, permite uma ampla compreensão dos processos biológicos ocorridos na metodologia adotada. Avaliações e alterações nas concentrações de reagentes e insumos utilizados, como também, análise de mudanças de temperatura, tipos de incubação ou mesmo variações de intervalo de tempo permitem o entendimento mais amplo de como os elementos que compõem o teste, como por exemplo, o vírus e a célula, reagem a essas mudanças em sistemas controlados laboratorialmente (Timiryasova T.M.*et al.*, 2013).

Avaliando não somente variações externas, mas considerando também a variação das reações biológicas intrínsecas ocorridas no teste é possível estabelecer critérios internos de aceitação para acompanhar de modo eficiente a qualidade dos resultados obtidos (Thomas S. J. *et al.*, 2009).

Em conjunto com a validação, a padronização de um método analítico, seja adaptação ou implementação, envolve propostas metodológicas que julgue a sua eficiência na rotina do laboratório (ISO/IEC17025, 2005). Determinado método é considerado validado se sua finalidade ao qual se é destinado estiver de acordo com os pré-requisitos estabelecidos pela legislação vigente (RDC 27, ANVISA, 2012; ISO/IEC17025, 2005). Isto garante qualidade, idoneidade e credibilidade de seus resultados. Com isso, torna-se imprescindível a adoção de alguns parâmetros ditos como essenciais para validar um método, tais como: exatidão, precisão, seletividade, linearidade, limites de detecção, variações intra-laboratoriais e inter-laboratoriais, que são ferramentas que avaliam o desempenho de um método (Brito *et al.*, 2003; RDC 027, ANVISA, 2012; ICH,Q2(R1), 1996).

Em termos de validação de ensaios biológicos, alguns pesquisadores adotam apenas a precisão com painel de soros distintos para validar o teste. Em relação a precisão (homogeneidade), esta é a avaliação da proximidade de vários resultados obtidos, numa sequência de múltiplos testes da mesma amostra (Cohen B. J. *et al.*, 2007). São considerados três níveis: repetitividade (precisão intra-corrída); precisão intermediária (precisão inter-corrídas) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratórios) (ANVISA, RE. 899, 2003). Por outro lado, outros pesquisadores adotam não somente a precisão, como também a exatidão e robustez para garantir a validação do teste (Timiryasova T. M. *et al.*, 2013). A exatidão consiste em verificar a proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor verdadeiro (RDC 27, ANVISA, 2012). A análise da exatidão é realizada da mesma forma que a da precisão, ou seja, através de avaliações intercorrída e intracorrída, utilizando-se um painel de soros distintos (Timiryasova T. M. *et al.*, 2013).

A robustez avalia o impacto de resposta quando o teste é submetido a diferentes variações no decorrer do processo, ou seja, determina o quanto esse teste é sensível às mínimas alterações de temperatura, intervalo de tempo e performance do operador (Timiryasova T. M. *et al.*, 2013).

O órgão regulatório nacional, a ANVISA, propõe e exige a validação da metodologia analítica empregada obedecendo os critérios da RDC 27, que foi sancionada em 2012 para permitir a emissão de laudos e o registro de novos produtos (RDC 27, ANVISA, 2012).

2. JUSTIFICATIVA

O teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise - PRNT é um teste padrão empregado na avaliação da eficácia vacinal e apresenta frente a outros testes virológicos, maior especificidade na detecção e quantificação de anticorpos neutralizantes. No entanto, o mesmo demanda tempo para a obtenção de um resultado e pode também apresentar variabilidade se as etapas do processo não estiverem bem estabelecidas e com critérios de aceitação definidos, de modo a permitir melhor controle do processo. Dentro deste contexto é necessária uma avaliação nas condições analíticas do teste, visando promover a padronização e a validação da técnica de neutralização em placa de 96 poços para atribuir melhoria na sua eficiência e eficácia. E com isso, garantir e prover a sua implementação para a avaliação da imunogenicidade da vacina combinada de caxumba.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente estudo visa padronizar e validar o teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise em placa de 96 poços para avaliar a imunogenicidade vacinal da caxumba.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a melhor multiplicidade de infecção viral (MOI) para a elaboração de um protocolo de produção de suspensão viral (banco de trabalho) para a utilização nos testes;

- Avaliar o tempo de sedimentação celular, influência do tamponamento utilizando dois tipos de tampões, concentração de solução semi-sólida (CMC) e tempo de incubação final, a fim de estabelecer a condição analítica que apresente melhores resultados em um intervalo de tempo mais reduzido;

- Avaliar a interferência do tempo de “neutralização” (1 ou 2 horas) na potência do vírus;

- Avaliar a interferência do tempo de neutralização (1 e 2 horas) na ligação vírus - soro;

- Determinar o melhor ponto de corte (cut-off) do teste proposto comparando o PRNT com o ELISA;

- Estabelecer critérios de aceitação para o teste em relação a faixa de variação do vírus e dos soros padrões;

- Validar o PRNT avaliando parâmetros como: linearidade, especificidade, exatidão e precisão, preconizados pela RDC 27 da ANVISA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV), pertencente a Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC) de Bio-Manguinhos, onde foram realizados os ensaios para padronização e validação da metodologia. O mesmo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Clínica do Instituto Nacional de Infectologia (IPEC).

4.1. Vírus

O vírus da caxumba utilizado neste estudo foi isolado em 1995 de um paciente de seis anos de idade, em Manchester/Inglaterra. O mesmo foi submetido ao processo de cultivo com quatro passagens em garrafas estacionárias (uma realizada em Manchester, duas no Reino Unido (*Virus reference department* - VRD) e uma no Rio de Janeiro) contendo células Vero (linhagem celular de rim de macaco verde africano), (*Cercopithecus aethiops*). Posteriormente, o vírus foi sequenciado e denominado **ManchS1/UK/95**. No LATEV, foi propagado por mais duas vezes em cultivos de garrafas estacionárias de células Vero. Após fracionamento, foi congelado e armazenado em freezer -70°C.

4.2. Suspensão celular

As células Vero utilizadas nos ensaios foram obtidas através da *American Type Culture Collection* (ATCC, CCL81) e expandidas a partir do banco trabalho de células (mantido a -196°C em container de nitrogênio líquido). Estas foram mantidas em meio 199 com sais de Earle's, tamponado com 2,5% bicarbonato de sódio (4,4% gaseificado) e suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado e 1% de antibiótico (garamicina 1/10).

4.3. Soros amostrais

Foram utilizados os soros provenientes do estudo intitulado “Estudo de imunogenicidade e reatogenicidade da vacina tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola) em crianças brasileiras com 12-15 meses de idade: validação clínica e segurança da vacina produzida em Biomanguinhos/Fiocruz”, aprovado pelo CEP SMS – RJ em 04 de abril de 2008 (CAAE 0049.0.314.000-08). Este foi um estudo não controlado, longitudinal, realizado em amostras de 150 crianças de 12-15 meses de idade, que foram coletadas em três unidades de saúde do município do Rio de Janeiro que receberam a vacina MMR (tríplice viral) combinados de acordo com o calendário de imunização básica. O referido estudo já foi finalizado e os resultados publicados (Santos E. M. *et al.*, 2014).

A utilização desses soros foi autorizada pela Assessoria de Estudos Clínicos em Imunobiológicos (ASCLIM), setor responsável pela pesquisa clínica em seres humanos, do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/Fiocruz (Bio-Manguinhos). Entretanto, como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do mesmo não contemplava na época a utilização de alíquotas do material biológico (soro) em estudos futuros, o pedido para utilização desses soros neste trabalho foi submetido ao CEP e aprovado em 11/12/2014 sob o nº 34825414.5.0000.5262.

4.4. Soros Padrões

O soro padrão negativo que foi utilizado neste trabalho é proveniente de primata não humano. O material foi cedido pelo Laboratório de Experimentação Animal - LAEAN/Bio-Manguinhos, já os soros padrões positivos utilizados são provenientes de um projeto executado em paralelo, intitulado: “Protocolo para a obtenção e produção de soros *“In House”* para testes de Neutralização por Redução de Placas de Lise (PRNT)”. Este projeto foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/Instituto Nacional de Infectologia/Fiocruz, protocolo CAAE 15120613.4.0000.5262.

4.5. Determinação da Multiplicidade de infecção viral (MOI) para a produção viral

4.5.1. Cinética viral

O vírus do estoque original (**ManchS1/UK/95**) foi descongelado e diluído em meio 199 com sais de Earle's, tamponado com 2,5% bicarbonato de sódio (4,4%), suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado e 1% de antibiótico (garamicina 1/10). Foram testados 3 diferentes MOIs: 0,1; 0,01; 0,001. Cada MOI testado foi calculado com duas concentrações celulares distintas: 70.000 céls/mL e 233.000 céls/mL, a partir da fórmula (1).

Fórmula (1):

$$\text{MOI} = \frac{\text{UFP}}{\text{Células}}$$

Onde UFP significa unidade formadora de placa.

Foram inoculados 2 mL de cada suspensão viral diluída, em cada garrafa de 175cm² contendo células Vero (confeccionadas com 24 horas de antecedência). Ao total foram inoculadas seis garrafas, sendo três com 70.000 céls/mL e três com 233.000 céls/mL. Para melhor visualização, o quadro 2 mostra a ordem dos inóculos com os respectivos MOIs testados.

Quadro 2- Concentração do MOI utilizado na cinética viral

Garrafa	MOI	Concentração celular
A	0,1	70.000 céls/mL
B	0,1	233.000 céls/mL
C	0,01	70.000 céls/mL
D	0,01	233.000 céls/mL
E	0,001	70.000 céls/mL
F	0,001	233.000 céls/mL

As garrafas inoculadas com o vírus foram incubadas à 37°C em estufa B.O.D. (demanda bioquímica de oxigênio) por 1 hora, com homogeneização a cada 15 minutos para garantir maior contato do vírus com a monocamada celular. Após este período de adsorção foram adicionados às garrafas, 75 mL de meio 199 suplementado, conforme descrito acima.

Para acompanhar a cinética de replicação viral nas diferentes condições, diariamente foi coletado 500 µL de sobrenadante de cada garrafa, já realizando a primeira coleta uma hora após a infecção (amostra dia 0). As amostras foram coletadas ao longo de oito dias consecutivos, obtendo-se ao final um volume total de 4mL de sobrenadante de cada garrafa. Os criotubos contendo as amostras foram congelados em freezer a -70°C para posterior determinação dos títulos virais.

4.5.2. Titulação viral em placas de 24 poços

As alíquotas coletadas na cinética foram descongeladas e tituladas para a determinação do título viral (UFP/mL). Cada alíquota foi diluída numa sequência de 6 diluições seriadas, obedecendo o fator 10 de diluição. Portanto, para cada placa de 24 poços, cada letra corresponde à sequência de diluição seriada de uma alíquota. A primeira diluição é realizada no poço 1, obtendo-se a diluição inicial de 1:10 (100 µl de vírus + 900 µl de diluente). O volume de 100 µL é posteriormente passado para o poço seguinte (já contendo 900 µl de diluente) e assim sucessivamente, até atingir a

diluição final de 1: 1.000.000 (poço 6). A Figura 5 representa um esquema das diluições seriadas realizadas nas placas de 24 poços.

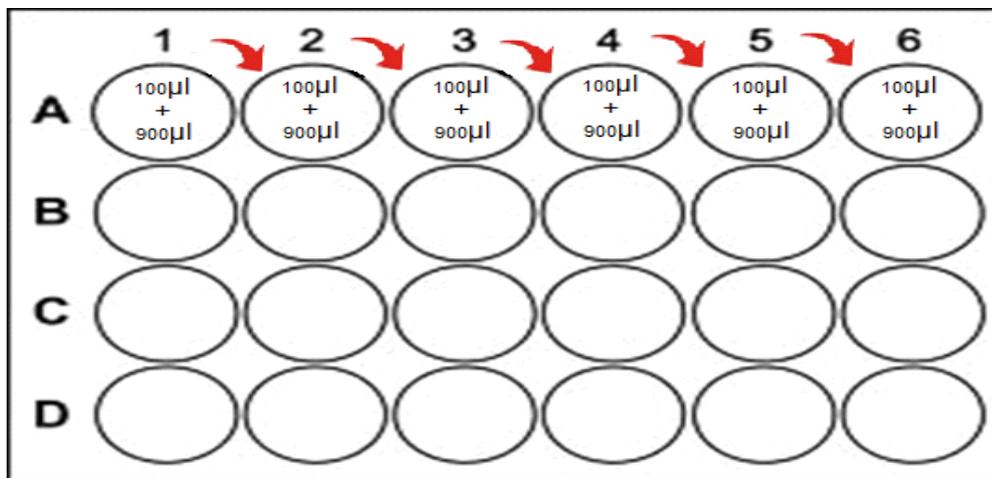


Figura 5 - Sequência ilustrativa da diluição viral realizada na placa de 24 poços. (A-D): cada letra corresponde a uma alíquota a ser diluída. (1-6): diluição seriada de 1:10 até 1:1000.000.

Posteriormente, 100 µl de cada diluição foram inoculados em duplicata em uma placa de 24 poços com a monocamada de células Vero formada (com densidade de aproximadamente 333.000 céls/mL, confeccionadas com 24 horas de antecedência). Para melhor compreensão, a Figura 6, demonstra a distribuição do inóculo de cada alíquota na placa de 24 poços com a monocamada celular formada.

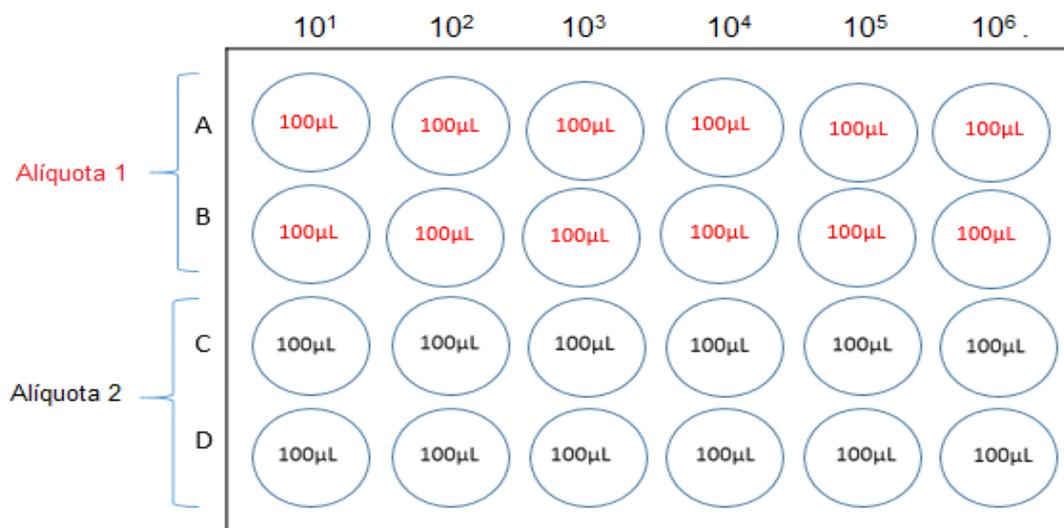


Figura 6 – Esquema de distribuição dos inóculos na placa de 24 poços com monocamada celular pré-formada. (A-B): duplicata das seis diluições de uma alíquota. (C-D): duplicata das seis diluis de uma outra

Por conseguinte, as placas de 24 poços foram incubadas à 37°C por 1 hora em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ (adsorção viral) e homogenizadas a cada 15 minutos. Após esse intervalo, os inóculos foram aspirados, e posteriormente foram adicionados em cada poço 3 mL de solução fixadora de carboximetilcelulose 2% (CMC, Sigma, EUA) acrescida de 5% NaHCO₃, 5% de soro fetal bovino e 1% de gamicina em meio Earle 199. Após 7 dias à 37°C e 5% de CO₂, as placas foram fixadas com solução de formaldeído a 5%, seguido de incubação a temperatura ambiente por 1 dia. Após este período, foram realizadas lavagens com água corrente até a completa remoção da solução de formaldeído e CMC. Solução de cristal violeta 2% foi acrescentada em cada poço, seguido de repouso à temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, as placas foram lavadas e acondicionadas em estufa para secagem. Finalizado o processo, as placas foram fotografadas e contadas com o auxílio do equipamento BioSpot 5.0 Professional. Os cálculos para a determinação dos títulos virais em UFP/mL, foram feitos em uma planilha no programa Excel 2010, utilizando a Fórmula (2).

Fórmula (2):

Log da diluição do vírus na placa + Log da contagem de UFP + log do fator de diluição da amostra = log de UFP/mL.

4.5.3. Quantificação de RNA e proteína viral

As alíquotas da curva de replicação viral foram descongeladas e centrifugadas a 3000 RPM por 5 minutos. Em seguida foram quantificadas pelo equipamento Nanodrop 2000c, utilizando-se um volume de 2 µl de cada alíquota para a quantificação da proteína total (comprimento de onda de 280 nm). Após esse procedimento foi realizada a extração de RNA total, seguindo o o protocolo do Kit Qiagen (cat 52906).

Os resultados foram analisados pelo método de coeficiente de correlação linear de Pearson para verificar a relação entre a quantidade de RNA e de proteínas. Os dados do ensaio de RNA e proteína foram representados graficamente no programa estatístico R Core Team (2013) para a determinação do melhor dia de produção de vírus infecciosos.

Foi realizada uma nova cinética para confirmar os resultados obtidos anteriormente, definindo assim a produção viral.

4.5.4. Produção viral

A produção viral (estoques virais de trabalho) foi feita a partir do MOI definido na cinética viral descrita anteriormente. O processo decorre da seguinte maneira: duas garrafas de 175cm² foram confeccionadas com 24h de antecedência contendo células VERO. Após 24 horas o meio contido nas garrafas foi desprezado e as culturas celulares foram infectadas com o MOI estabelecido, em seguida essas garrafas foram incubadas por 1 hora em estufa de BOD à 37°C para a etapa de adsorção. Completada esta etapa foram adicionados 75mL de diluente (meio Earle's acrescido de 2,5%

NaHCO₃, 2% de soro fetal bovino e 1% de garamicina). Ao atingir o melhor dia de pico produtivo, todo o sobrenadante com conteúdo viral contido nas 2 garrafas foi coletado e centrifugado à uma temperatura de 4°C. Após a centrifugação, a suspensão viral foi acrescida de 8% de sorbitol (estabilizador) e mantida no gelo. Em seguida a suspensão viral foi fracionada em criotubos e as alíquotas imediatamente congeladas a -70° C.

4.6. O Teste de Neutralização por Redução de Placa de Lise - PRNT.

4.6.1. Quantificação de anticorpos presentes nos soros pelo PRNT estabelecido no laboratório

A execução do teste em microplacas de 96 poços iniciou-se pela adição de 50µl de diluente (preparado com meio 199 e suplementado conforme descrito no item 4.5.1, é distribuído em toda a placa, com exceção da linha H. Na linha H deve-se adicionar 80 µl de diluente, a partir do poço 1 até o poço 11.

Em seguida, são adicionados 20 µl de cada soro (amostra), em cada orifício correspondente da linha H, com exceção ao orifício 12, como mostra abaixo a figura 7. Ao término desta etapa, proceder com a diluição seriada (fator 2), partindo da diluição inicial (1:5) da linha H, até o final da placa da linha A (1: 640), ou seja, do 1 ao 11. A coluna 12 é destinada ao controle de vírus que não é submetido a diluição seriada. Ao final da homogeneização, com o objetivo de igualar os volumes, desprezar 50 µl. A partir de então, adicionar 50 µl de suspensão viral (que contenha aproximadamente 30 placas de lise), e incubar por 1 hora à 37°C em estufa de CO₂. Adicionar 50 µL de suspensão celular, contendo 800.000 cels/mL (suspensão celular preparada no intervalo da neutralização), e incubar à 37°C por 3 horas em estufa de CO₂. Após a incubação, desprezar o meio contido e adicionar 100 µl de CMC 2% e incubar por 6 dias em estufa de CO₂ à 37°C. A figura (7) ilustra a disposição das amostras na placa de 96 poços.

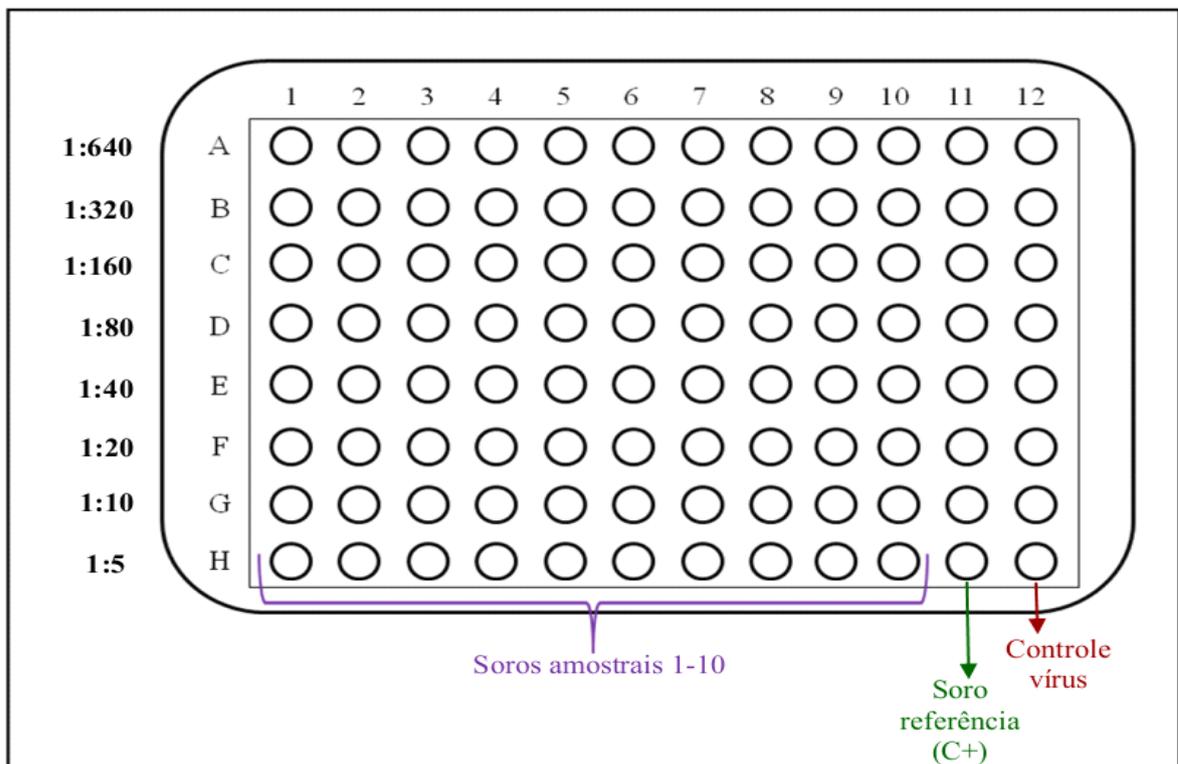


Figura 7- Desenho esquemático do teste em placa de 96 poços. As colunas de 1 até 10 são destinados à dosagem dos soros amostrais; a coluna 11 destina-se a dosar um soro padrão positivo (controle positivo) e a coluna 12 a quantificação de apenas vírus controle. Fonte: Simões, 2011.

4.6.2. Cálculo para obtenção do título de anticorpos de cada amostra.

O *end point* do teste é representado por 50% da média aritmética das placas de lise encontradas em todos os poços destinados somente ao controle de vírus (coluna 12 da placa).

O título do soro é obtido através da regressão linear calculada no programa Microsoft Excel 2007. Este cálculo consiste em determinar a diluição do soro que reduz em 50% o número de placas de lise obtidas no controle viral, ou seja, o título de anticorpos é determinado por interpolação das diluições correspondentes aos números de placas de lise imediatamente acima e abaixo do valor de *end point* (50%) do teste. Sendo o mesmo expresso em recíproca da diluição.

4.7. Padronização da técnica

De forma a definir um teste que proporcione melhor visualização do fenótipo de placa de lise, ou seja, que apresente qualidade na definição atrelado a diluição viral, diferentes condições analíticas foram analisadas. Os seguintes aspectos foram avaliados: tipos de tampões para o controle de pH, concentração da solução semi-sólida/CMC, tempo de incubação final, tempo de neutralização (mimetizando o PRNT), e o tempo de adsorção e sedimentação celular (3, 5 e 24 horas). As condições analíticas foram avaliadas por comparação qualitativa entre os resultados obtidos.

4.7.1. Tipos de tampões

A concentração do tampão HEPES é de 1 mol/L, com pH ajustado para 7,2. A solução pronta foi adicionada nos respectivos diluentes, em um volume que favoreceu o tamponamento.

Foram preparadas 2 formulações distintas de diluentes para os testes. O primeiro diluente contendo como tampão apenas a solução de bicarbonato de sódio e o segundo contendo solução HEPES (*Hepes sodium salt* - HEPES (marca (Sigma; lote H3784; fórmula molecular $C_8H_{17}N_2O_4SNa$) e solução de bicarbonato de sódio.

Então:

1º diluente:

A composição do primeiro diluente para a diluição viral foi de: meio 199 com sais de Earle's tamponado com 5% de bicarbonato de sódio (4,4% gaseificado), 1% de antibiótico (gentamicina diluída 1/10) e 0,4% de fungizona.

O outro diluente foi preparado nas mesmas concentrações definidas no parágrafo acima, sendo suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) para o preparo da suspensão celular.

2º diluente:

A composição do segundo diluente para a diluição viral foi de: meio 199 com sais de Earle´s, tamponado com 0,5% de bicarbonato de sódio (4,4% gaseificado) e com 1,5% de HEPES, 1% de antibiótico (gentamicina diluída 1/10) e 0,4% de fungizona.

O outro diluente foi preparado nas mesmas concentrações descritas no parágrafo acima, sendo suplementado com 5% de SFB para o preparo da suspensão celular.

4.7.2. Concentração da solução semi-sólida/CMC

O preparo da solução semi-sólida, consiste em pesar 90g de pó, diluir em 3 litros de água destilada e autoclavar a 121° graus por 30 minutos.

O CMC (Sigma; lote 080M0026V; fórmula molecular C₂₈H₃₀Na₈O₂₇) foi preparado com meio 199 com sais de Earle´s, tamponado com 5% de bicarbonato de sódio (4,4% gaseificado), 1% de antibiótico (gentamicina diluída 1/10) e 0,4% de fungizona, suplementado com 5% de SFB. No momento do uso foi diluído em água nas concentrações de 1,5% e 2%.

4.7.3. Definição da condição analítica e da diluição viral pela técnica PRNT

Para definir uma diluição que proporcione uma concentração aproximada de 30 UFP/poço (quantidade mínima que caracteriza a sensibilidade do teste) (Simões, 2011) é necessário que se faça uma diluição do vírus nos mesmos moldes do teste.

O experimento para determinar a diluição do vírus com as alterações analíticas do teste decorreu da seguinte forma: primeiramente o vírus foi descongelado e diluído 1:10 com o 1º e o 2º diluente (suspensões distintas). Em seguida, 100 µl dessas suspensões virais foram adicionadas em cada um dos 7 poços (A-G) correspondentes a coluna 1 da placa de 96 poços, conforme a Figura 8.

Placa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480
B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
C	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
F	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
G	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC

Figura 8 - Esquema de diluição seriada do vírus numa placa de 96 poços. Cada coluna corresponde a 7 réplicas de cada diluição viral descrita na linha A. R → replicada de cada diluição citada na linha A.

Após esse procedimento foram adicionados 50 µl dos respectivos diluentes (1^o e 2^o) em todos os poços da placa, exceto na coluna 1. Em seguida, o vírus foi diluído seriadamente (de forma horizontal na placa) no fator 2, iniciando-se em 1:10 (coluna 1) e finalizando em 1:20480 (coluna 12). Em seguida foram distribuídos 50µl de diluente em todos os poços da placa de 96 poços. As placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ e em estufa B.O.D. para a contemplar a etapa de neutralização (mimetizando o PRNT) de 1 e 2 horas. Completada esta etapa, o volume de 50µl de suspensão celular foi adicionado à todos os poços da placa, posteriormente sendo submetidos ao intervalo de adsorção e sedimentação de 3, 5 e 24 horas. A linha H foi destinada ao controle celular. Ao término do intervalo de adsorção/sedimentação foram adicionados 100µl de CMC nas concentrações de 1,5% e 2% para a incubação final a 37°C por 2, 3, 4 e 5 dias. Decorridos os dias de incubação, as placas foram fixadas com solução de formaldeído 5% e coradas com cristal violeta a 2%. Ao todo foram avaliadas 48 placas de vírus, com cada placa de 96 poços sendo correspondente à uma condição analítica do teste, conforme o quadro 3.

Análise das condições analíticas do teste.

Placa	Tempo de Neutralização (M) (h)	Tempo de sedimentação celular (h)	Tampão no diluente	Concentração de CMC	Incubação final
1	1	3	Hepes	1,5%	2(d)
2			NaHCO ₃	2%	
3		5	Hepes	1,5%	
4			NaHCO ₃	2%	
5		24	Hepes	1,5%	
6			NaHCO ₃	2%	
7	2	3	Hepes	1,5%	2(d)
8			NaHCO ₃	2%	
9		5	Hepes	1,5%	
10			NaHCO ₃	2%	
11		24	hepes	1,5%	
12			NaHCO ₃	2%	
13	1	3	Hepes	1,5%	3(d)
14			NaHCO ₃	2%	
15		5	Hepes	1,5%	
16			NaHCO ₃	2%	
17		24	Hepes	1,5%	
18			NaHCO ₃	2%	
19	2	3	Hepes	1,5%	3(d)
20			NaHCO ₃	2%	
21		5	Hepes	1,5%	
22			NaHCO ₃	2%	
23		24	Hepes	1,5%	
24			NaHCO ₃	2%	

Continuação

25	1	3	Hepes	1,5%	4(d)
26			NaHCO ₃	2%	
27		5	Hepes	1,5%	
28			NaHCO ₃	2%	
29		24	Hepes	1,5%	
30			NaHCO ₃	2%	
31	2	3	Hepes	1,5%	4(d)
32			NaHCO ₃	2%	
33		5	Hepes	1,5%	
34			NaHCO ₃	2%	
35		24	Hepes	1,5%	
36			NaHCO ₃	2%	
37	1	3	Hepes	1,5%	5(d)
38			NaHCO ₃	2%	
39		5	Hepes	1,5%	
40			NaHCO ₃	2%	
41		24	Hepes	1,5%	
42			NaHCO ₃	2%	
43	2	3	Hepes	1,5%	5(d)
44			NaHCO ₃	2%	
45		5	Hepes	1,5%	
46			NaHCO ₃	2%	
47		24	Hepes	1,5%	
48			NaHCO ₃	2%	

Quadro 3 - Representação esquemática das condições analíticas avaliadas nos moldes do ensaio de PRNT. (M): mimetização da etapa de neutralização, (h): hora e (d): dias.

Após a execução do experimento descrito anteriormente, os ensaios para análise das condições analíticas foram desmembrados e realizados em 4 dias de experimentos distintos, variando o tempo de incubação final (2, 3, 4 e 5 dias). Apenas

o ensaio com incubação final de 2 dias avaliou o tempo de adsorção/sedimentação celular com 24 horas. O desenho experimental está representado no Quadro 4.

Para cada dia de experimento, o procedimento de diluição viral seguiu conforme descrito acima, ou seja, o vírus foi diluído seriadamente de 1:10 até 1:20480 e quantificado em 7 réplicas em cada placa de 96 poços. Os resultados foram avaliados através de comparações qualitativas das placas de lise, no propósito de definir uma única condição analítica com uma diluição viral adequada ao teste.

Quadro 4 - Representação esquemática das condições analíticas executadas nos 4 ensaios variando o tempo de incubação final. (M): mimetização da etapa de neutralização, (h): hora e (d): dias.

	Condição Analítica Placa	Tempo de neutralização (M) (h)	Tempo de sedimentação celular (h)	Tampão no diluente	Concentração de CMC	Incubação final
1º dia	1	1	3	Hepes	1,5%	2(d)
	2			NaHCO ₃		
	3		5	Hepes		
	4			NaHCO ₃		
	5		24	Hepes		
	6			NaHCO ₃		
2º dia	7	1	3	Hepes	1,5%	3(d)
	8			NaHCO ₃		
	9		5	Hepes		
	10			NaHCO ₃		
3º dia	11	1	3	Hepes	1,5%	4(d)
	12			NaHCO ₃		
	13		5	Hepes		
	14			NaHCO ₃		
4º dia	15	1	3	Hepes	1,5%	5(d)
	16			NaHCO ₃		
	17		5	Hepes		
	18			NaHCO ₃		

4.7.4. Avaliação do período de “neutralização” viral (mimetizando a neutralização)

A partir da diluição eleita anteriormente no experimento que avaliou diferentes diluições virais, foram preparadas três suspensões virais: 1:1280 (diluição eleita), 1:640 (diluição imediatamente inferior) e 1:2560 (diluição imediatamente superior), incluindo melhor diluente (1º diluente), concentração de CMC (1,5%) e tempo de incubação final (4 dias). Essas suspensões foram avaliadas em diferentes tempos de incubação (1 e 2 horas), mimetizando a neutralização.

Duas placas de 96 poços foram utilizadas no teste. Primeiramente o vírus foi descongelado e imediatamente diluído em frasco estéril (diluições citadas acima). O volume de 50µl de cada suspensão viral foi adicionado em 32 poços da placa de 96 poços, seguido pela adição de 50µl de diluente. A 1ª placa foi acondicionada em estufa de CO₂ à 37°C sob 1 hora de incubação e a 2ª placa acondicionada em estufa de CO₂ à 37°C sob 2 horas de incubação. Após o período de incubação de cada placa, 50 µl de suspensão celular (800.000cél/s/mL) foram adicionados nas respectivas placas de 96 poços. Este experimento foi realizado por três dias distintos. Para melhor compreensão segue o desenho experimental na Figura 9.

Placa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
SUSP Viral	1: 640				1: 1280				1: 2560			

Figura 9 - Esquema de distribuição das três diferentes suspensões virais na placa de 96 poços para avaliar o tempo de incubação viral (1 e 2 horas). (1-4): suspensão viral 1:640; (5-8): suspensão viral 1:1280; (9-12): suspensão viral 1:2560.

A análise dos dados decorreu através dos testes de hipótese de forma a considerar as médias de cada suspensão viral.

Foram formuladas as seguintes hipóteses:

H0: $\mu_1 = \mu_2$. As médias das suspensões virais submetidas a 1 e 2 horas de incubação eram iguais;

H1: $\mu_1 \neq \mu_2$. As médias das suspensões virais submetidas a 1 e 2 horas de incubação não eram iguais.

Os testes foram calculados com base no teste T de Student, pareado, bicaudal, com nível de significância de 5%. Foi utilizado o programa estatístico R (R Core Team, 2013).

4.7.5. Avaliação do período de 1 e 2 horas de neutralização

Foram realizadas 20 dosagens do soro padrão *in house* MAX(C+) (positivo para a presença de anticorpos neutralizantes) e 20 dosagens do soro *in house* AA 21(C-) (negativo para a presença de anticorpos neutralizantes) com a suspensão viral de 1:1600, definida no item acima através de cálculo matemático de regressão linear (vírus desafio). Esse ensaio foi realizado em dois dias distintos, totalizando 40 dosagens de cada soro mencionado.

Cada soro padrão foi dosado 20 vezes e submetido ao intervalo de 1 hora de neutralização. Em paralelo, os mesmos padrões foram dosados 20 vezes e submetidos ao intervalo de 2 horas de neutralização. O processo de execução decorreu na seguinte forma: foram adicionados 50 μ l de diluente em toda a placa, exceto a linha H, que foi adicionada com 80 μ l (poço 1 ao 10). A coluna 12 foi destinada ao controle de vírus. Em seguida, foram adicionados 20 μ l dos soros padrões na linha H, com exceção ao poço 11 e 12. Posteriormente foi realizada a diluição seriada, obedecendo o fator 2 de diluição, iniciando em 1:5 (linha H) e finalizando em 1:640 (linha A). Ao final da homogeneização foram desprezados 50 μ l, para igualar os volumes na placa. A partir de então, adicionou-se 50 μ l de suspensão viral diluída à

1:1600, submetendo cada placa a um intervalo de neutralização (1 e 2 horas), à 37°C, em estufa de CO₂.

As análises foram direcionadas nas diferenças observadas entre as médias dos títulos de anticorpos neutralizantes quando submetidos a diferentes intervalos de tempo de neutralização.

Foram formuladas as seguintes hipóteses:

H0: $\mu_1 = \mu_2$. As médias de títulos de anticorpos obtidas do soro padrão submetido a 1 e 2 horas de neutralização eram iguais;

H1: $\mu_1 \neq \mu_2$. As médias de títulos de anticorpos obtidas do soro padrão submetido a 1 e 2 horas de neutralização não eram iguais.

A diferença entre as médias foi avaliada pelo teste T-Student, pareado, bicaudal, com nível de significância de 5%. Foi utilizado o programa estatístico R (R Core Team, 2013).

4.8. Ponto de corte e eficiência do PRNT frente ao teste ELISA

Após a definição do tempo ideal para a etapa de neutralização do teste foram dosados 75 soros pré e pós-imunização, oriundos do “Estudo sorológico de sarampo, rubéola e caxumba em crianças de 12 a 15 meses de idade imunizadas com a tríplice viral” para a estimação de um ponto de corte para o teste.

Cada soro correspondente ao pré e pós vacinação, foi dosado de forma pareada no teste, de acordo com o novo protocolo do método de ensaio PRNT, definido neste trabalho.

A realização do teste em microplacas de 96 poços iniciou-se pela adição de 50µl de diluente (preparado com meio 199 e suplementado conforme descrito no item 4.5.1) em toda a placa, com exceção da linha H. Foram adicionados 80 µl de diluente (poço 1 ao 11), e em seguida foram adicionados 20µl dos soros (amostras), por cada poço da linha H, com exceção do poço 12. Ao término desta etapa, foi realizada a

diluição seriada (fator 2), partindo da diluição inicial de 1:5 (linha H) até 1:640 (linha A). Ao final da homogeneização foram desprezados 50µl para igualar o volume na placa. A partir de então foram adicionados 50µl de suspensão viral (1:1600) em toda placa, seguida por incubação à 37°C por 2 horas em estufa de CO₂. Ao final deste período foram adicionados 50µL de suspensão celular (800.000cél/s/mL). Completada a etapa de adsorção/sedimentação de 3 horas foram adicionados 100µl de CMC 1,5%. Após 4 dias de incubação à 37°C em estufa de CO₂ as placas foram fixadas com formaldeído à 5% e coradas com cristal à 2%.

As análises realizadas para a determinação de um ponto de corte adequado ao teste foram realizadas através da *Receiver Operating Characteristic* (Curva ROC), utilizando a metodologia de DeLong *et al.* 1988, recomendada pelo MedCalc Software. Os títulos de PRNT obtidos de cada amostra (soro) foram inseridos em uma tabela junto com os valores 1 e 0, atribuídos aos resultados positivo e negativo, respectivamente, quando comparados com os resultados de ELISA. A determinação do *cut-off* foi calculada considerando o índice de Youden, que propõe encontrar um valor ótimo que melhor aproxima os parâmetros de sensibilidade e especificidade do teste. Além disso, foram avaliados os índices de verossimilhança e a exatidão global através da área sob a curva e valores preditivos e negativos para o diagnóstico de caxumba por PRNT, utilizando MedCalc Statistical Software version 15.2.1 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2015). Foram definidos valores percentuais de resultados concordantes e discordantes de PRNT com o ELISA, utilizando o GraphPad Prism version 5.0a.

4.9. Critérios de aceitação do teste

4.9.1. Determinação do valor nominal e dos critérios de aceitação dos padrões

Os soros padrões internos (*in House*), categorizados como: negativo, positivo baixo, médio e alto (quanto a concentração de anticorpos neutralizantes) foram dosados pelo PRNT padronizado neste trabalho.

Foram realizados 3 ensaios distintos, com 10 dosagens dos padrões por ensaio, totalizando 30 dosagens de cada.

Para determinação do valor nominal dos respectivos padrões foram calculadas as médias, os desvios padrões e os intervalos de confiança de 95% dos títulos das 30 dosagens totais de cada padrão. Para avaliação da faixa de variação, o maior título observado foi dividido pelo menor título obtido nas 30 dosagens de cada padrão. Foi utilizado o programa Excel 2013

4.9.2. Critérios de aceitação do controle de vírus

A partir da definição da diluição viral de 1:1600 foi realizado um gráfico de histograma de frequência no programa Excel 2013 para estabelecer a faixa de variação do controle viral ao longo do estudo.

4.10. Validação

4.10.1. Curva de calibração

Foram realizadas 3 curvas de calibração independentes, que permitiram definir 5 concentrações: CQA, CQB, CQD, CQM e LIQ. A partir dessas concentrações foram avaliadas: precisão intracorrída e intercorrída, exatidão intracorrída e intercorrída e linearidade do teste.

As 5 concentrações estão definidas segunda a RDC, como:

- CQA - Amostra de controle de qualidade de alta concentração, que corresponde a uma amostra com a concentração entre 75% e 85% da maior concentração da curva de calibração;

- CQB - Amostra de controle de qualidade de baixa concentração, que corresponde a uma amostra com até 3 vezes o limite inferior de quantificação do método (LIQ);

- CQD - Amostra de controle de qualidade de diluição, que corresponde à amostra em concentração acima da maior concentração da curva de calibração (CQA);

- CQM - Amostra de controle de qualidade de média concentração, que corresponde à amostra em concentração próxima à média entre os limites inferior e superior de quantificação;

- LIQ - Limite inferior de quantificação, amostra de menor concentração na curva de calibração.

As amostras foram preparadas a partir da diluição do soro padrão *in house* 161, que é sabidamente um soro com título elevado de anticorpos neutralizantes para o vírus da caxumba. Após a diluição seriada do soro de 1:2 até 1:1024 (figura 11), cada diluição foi dosada pelo PRNT definido neste estudo.

Foram incluídos no teste um outro padrão positivo e um padrão negativo. Foram feitos três ensaios independentes.

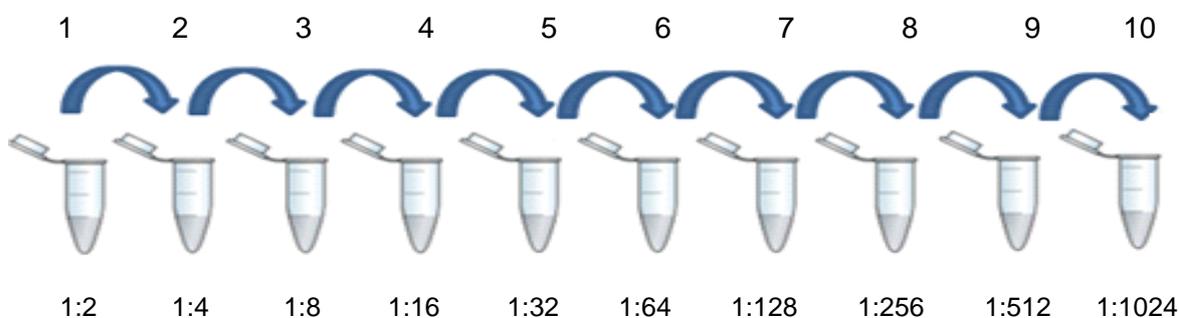


Figura 10 - Diluição seriada do soro SIH 161 para a realização da curva de calibração.

As diluições foram dosadas em 5 réplicas por ensaio (Figura 11), e os padrões positivo (CM+) e negativo (AA21) em 3 réplicas por ensaio. O processo de execução do teste foi realizado conforme o item 4.8 deste estudo.

PLACA 1

PLACA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												CV
B												CV
C												CV
D												CV
E												CV
F												CV
G												CV
H	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4		

PLACA 2

PLACA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												CV
B												CV
C												CV
D												CV
E												CV
F												CV
G												CV
H	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16		

PLACA 3

PLACA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												CV
B												CV
C												CV
D												CV
E												CV
F												CV
G												CV
H	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64		

PLACA 4

PLACA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												CV
B												CV
C												CV
D												CV
E												CV
F												CV
G												CV
H	1:128	1:128	1:128	1:128	1:128	1:256	1:256	1:256	1:256	1:256		

PLACA 5

PLACA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												CV
B												CV
C												CV
D												CV
E												CV
F												CV
G												CV
H	1:512	1:512	1:512	1:512	1:512	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024		

PLACA 6

PLACA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												CV
B												CV
C												CV
D												CV
E												CV
F												CV
G												CV
H	CM+	CM+	CM+	AA21	AA21	AA21						

Figura 11 - Distribuição das amostras de soro nas 6 placas de 96 poços para a obtenção da curva de calibração. Cada diluição do soro previamente preparada foi dosada em 5 réplicas. (CV): controle de vírus, (CM+): padrão positivo, (AA21): padrão negativo.

As respectivas concentrações: LIQ, CQA, CQB, CQD e CQM, foram definidas através da média dos títulos obtidos nas 3 curvas de calibração.

4.10.2. Precisão Intracorrída e intercorrída

A avaliação da precisão intracorrída foi realizada através do coeficiente de variação da média dos títulos em log de cada concentração (LIQ, CQA, CQB, CQD e CQM) de uma curva de calibração. A precisão intercorrída foi realizada através do coeficiente de variação de cada concentração (LIQ, CQA, CQB, CQD e CQM), referente as 3 curvas de calibração.

Segundo a RDC 27 os valores obtidos não deverão ultrapassar 15%, exceto para o LIQ, para o qual não se admite valores maiores que 20%.

4.10.3. Exatidão Intracorrída e Intercorrída

A avaliação da exatidão foi expressa pelo erro padrão relativo (EPR) para cada uma das 5 concentrações (LIQ, CQA, CQB, CQD e CQM), conforme a fórmula (3). Na exatidão intracorrída foi utilizada a curva três, na qual cada ponto da curva foi avaliado quanto ao valor experimental frente ao valor nominal. Na exatidão intercorrída foram avaliadas as três curvas.

Fórmula 3:

$$\text{EPR} = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}) \times 100}{\text{Valor nominal}}$$

Não foram admitidos valores que ultrapassem a faixa de 15% em relação ao valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de 20%. Para avaliar a exatidão intercorrída, o cálculo foi efetuado conforme citado para o intraensaio, sendo neste caso considerados os resultados dos três dias de ensaios.

4.10.4. Seletividade (especificidade)

Para avaliar a especificidade do PRNT para caxumba foi utilizado um soro padrão SIH 142 positivo para caxumba e negativo para sarampo, como soro desafio no teste. Para tanto, ensaios distintos utilizando como vírus desafio o vírus de sarampo e de caxumba foram realizados. Numa placa de 96 poços, o soro citado foi dosado em 3 réplicas, sendo o mesmo desafiado com o vírus caxumba. Foram incluídos no teste os padrões AA61(-) e o MAX(+) para caxumba. Em outra placa de 96 poços foi realizado o mesmo esquema de dosagens, sendo desafiado com o vírus do sarampo,

conforme a figura 12. Foram incluídos no teste os padrões AA61(-) e o 60/12 (+) para sarampo.

Placa 1												
Placa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SIH(+)	SIH(+)	SIH(+)	AA61	MAX	-	-	-	-	CV	CV	CV
B	SIH(+)	SIH(+)	SIH(+)	AA61	MAX	-	-	-	-	CV	CV	CV
C	SIH(+)	SIH(+)	SIH(+)	AA61	MAX	-	-	-	-	CV	CV	CV
D	SIH(+)	SIH(+)	SIH(+)	AA61	MAX	-	-	-	-	CV	CV	CV
E	SIH(+)	SIH(+)	SIH(+)	AA61	MAX	-	-	-	-	CV	CV	CV
F	SIH(+)	SIH(+)	SIH(+)	AA61	MAX	-	-	-	-	CV	CV	CV
G	SIH(+)	SIH(+)	SIH(+)	AA61	MAX	-	-	-	-	CV	CV	CV
H	SIH(+)	SIH(+)	SIH(+)	AA61	MAX	-	-	-	-	CV	CV	CV

Placa 2												
Placa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SIH(+)	SIH(+)	SIH(+)	AA61	60/12	-	-	-	-	CV	CV	CV
B	SIH(+)	SIH(+)	SIH(+)	AA61	60/12	-	-	-	-	CV	CV	CV
C	SIH(+)	SIH(+)	SIH(+)	AA61	60/12	-	-	-	-	CV	CV	CV
D	SIH(+)	SIH(+)	SIH(+)	AA61	60/12	-	-	-	-	CV	CV	CV
E	SIH(+)	SIH(+)	SIH(+)	AA61	60/12	-	-	-	-	CV	CV	CV
F	SIH(+)	SIH(+)	SIH(+)	AA61	60/12	-	-	-	-	CV	CV	CV
G	SIH(+)	SIH(+)	SIH(+)	AA61	60/12	-	-	-	-	CV	CV	CV
H	SIH(+)	SIH(+)	SIH(+)	AA61	60/12	-	-	-	-	CV	CV	CV

Figura 12 - Distribuição dos soros nas placas de 96 poços para verificar a especificidade. SIH 142(+) → soro positivo para caxumba e negativo para sarampo, AA61(-) → soro padrão negativo para caxumba e o padrão MAX positivo para a caxumba. 60/12 soros padrão positivo para sarampo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cinética viral

A primeira etapa deste trabalho consistiu em avaliar o perfil cinético do vírus do estoque original (**ManchS1/UK/95**) em diferentes multiplicidades de infecção (MOIs) (0,1; 0,01; 0,001) com o objetivo de definir a melhor concentração viral a ser usada como inóculo. A condição de MOI escolhida deve ser uma relação harmônica entre a quantidade de vírus e uma determinada quantidade de células, culminando com um pico de produção de vírus infecciosos num determinado dia pós-infecção.

O gráfico 1 mostra que para todas as variações empregadas, o segundo dia de produção viral foi o que apresentou a maior quantidade de vírus infecciosos. A melhor condição encontrada foi observada na garrafa F, ou seja, com o MOI de 0,001 e densidade celular de 233.000 cel/mL.

Os resultados obtidos no primeiro ensaio de titulação foram repetidos em outro ensaio independente para confirmação. A partir dos resultados obtidos foi calculada a média. Cada média corresponde à titulação viral obtida em cada dia de cultivo pós-infecção para cada garrafa analisada (A, B, C, D, E e F). Conforme observado, a partir do 2º dia pós-infecção, não foi possível determinar diferenças nas médias da titulação viral entre as diferentes garrafas se considerarmos os intervalos de confiança de 95% dessas médias (tracejado pontilhado). Dessa forma, foi observado que no 2º dia pós-infecção, houve diferença significativa na média da titulação viral na garrafa F em relação às outras garrafas no mesmo ponto temporal. A tabela 2 mostra a média dos títulos de cada garrafa em UFP/mL (relativo aos dois ensaios de titulação) e o intervalo de confiança de 95% correspondente apenas ao segundo o dia pós-infecção (DPI).

Tabela 2 - Título viral de todas as garrafas (A, B, C, D, E, F) referente a 2º DPI.

2ºDPI		
Garrafa	Log UFP/mL	IC95%
A	4,52	[3.41; 5.62]
B	5,16	[4.66; 5.65]
C	5,54	[5.4; 5.69]
D	5,76	[5.74; 5.78]
E	5,67	[5.57; 5.77]
F	6,47	[6.39; 6.55]

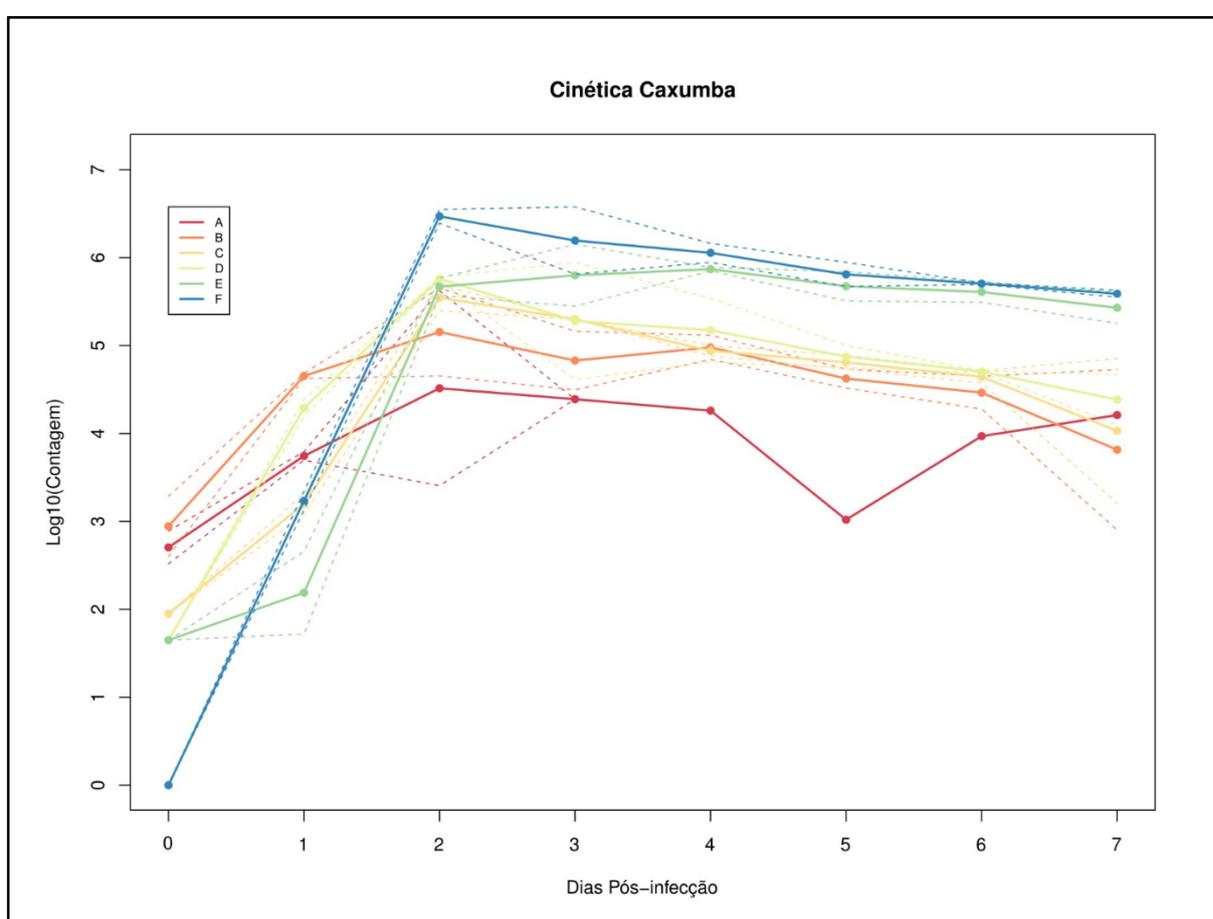


Gráfico 1 - Análise do perfil cinético do vírus da caxumba – Cada ponto de cada linha corresponde à média da titulação viral observada em cada garrafa, a cada dia pós-infecção. As linhas correspondem as letras que representam as diferentes condições de infecção (**A** – MOI 0,1; 70.000cél/s/mL; **B** – MOI 0,1; 233.000cél/s/mL; **C** – MOI 0,01- 70.000cél/s/mL; **D** – MOI 0,01- 233.000cél/s/mL; **E** – MOI 0,001- 30.000 células/mL; **F** – MOI 0,001 - 233.000cél/s/mL). As linhas tracejadas representam o intervalo de confiança de 95% das médias para as diferentes garrafas ao longo do tempo de pós-infecção.

5.2. Quantificação de RNA e proteína viral

Não foi possível observar correlações lineares significativas entre a quantificação de RNA total e a quantificação de proteína viral para qualquer das garrafas (A, B, C, D, E e F). Porém, na garrafa F observamos um resultado sugestivo de correlação linear ($\rho=64,1\%$; $p\text{-valor}=0,087$) entre essas duas medidas.

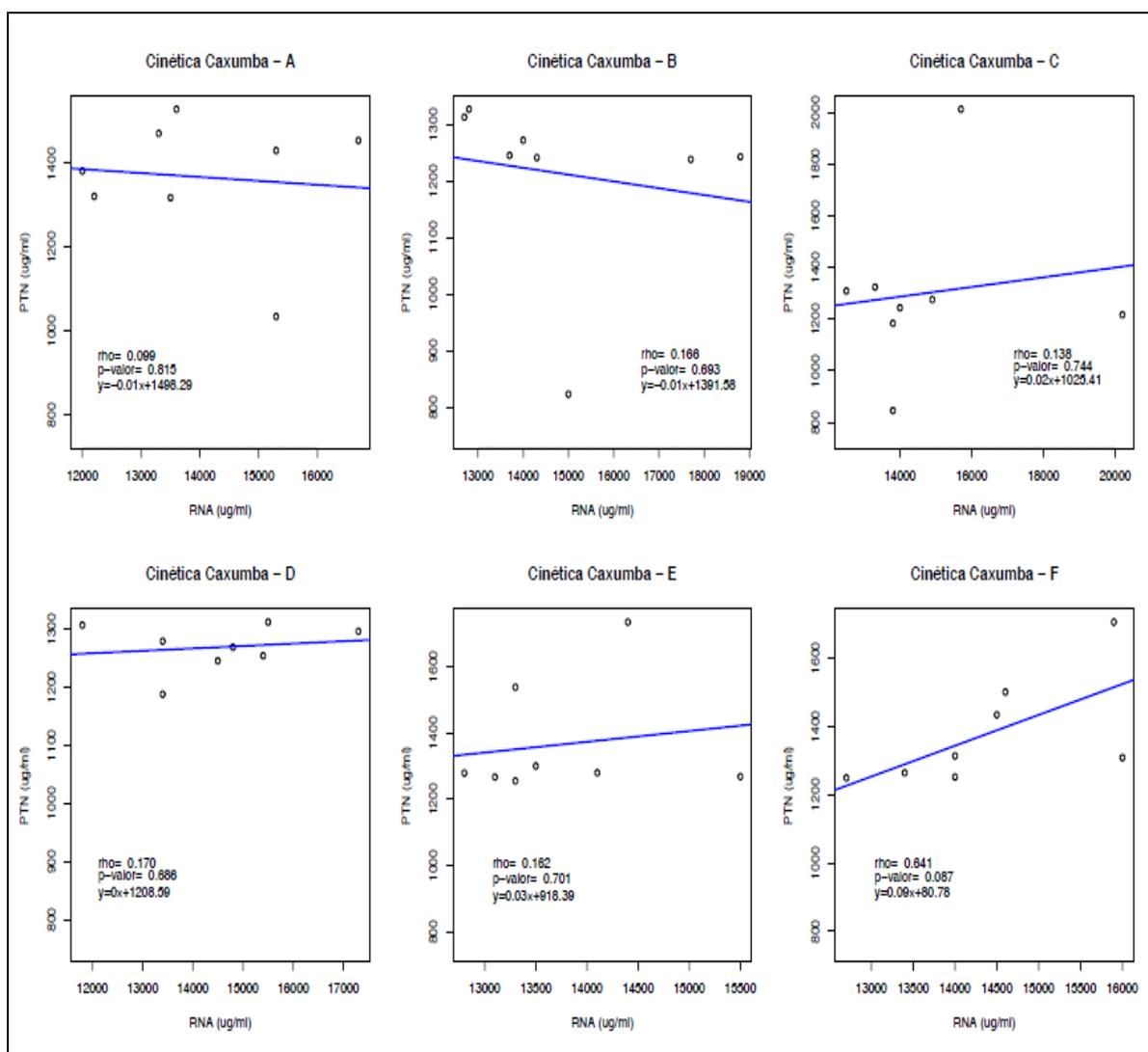


Figura 13 – Análise de correlação linear de RNA e Proteína de cada garrafa. Cada gráfico corresponde à correlação linear entre a quantificação de proteína total e a quantificação de RNA total de todo o perfil de propagação viral (8 dias) de cada garrafa (A, B, C, D, E, e F). Nenhum dos gráficos apresentam correlação linear próxima a 1 ou significativa, ou seja, com $p\text{-valores}$ observados inferiores ou iguais a 0,05.

Nenhum dos gráficos da figura 13 apresentaram correlação linear próxima a 1 ou significativa, ou seja, com p-valores observados inferiores ou iguais a 0,05.

A não correlação de proteína e RNA pode estar relacionada a adoção de diferentes protocolos de obtenção e quantificação. A quantificação de proteínas foi realizada a partir do sobrenadante, contendo partículas virais e apesar da centrifugação, a amostra não foi purificada, podendo conter uma proporção de proteínas celulares. Em relação à quantificação de RNA, o mesmo foi submetido ao processo de extração total, onde também pode conter outros RNAs que não sejam da partícula viral.

O perfil cinético possibilita uma adequação de propagação viral de modo sistematizado, favorecendo a probabilidade de obtenção de partículas completas (infectantes) (Ammour Y. *et al.*, 2013).

Partículas virais incompletas não infectam a célula hospedeira, acarretando dessa forma, em resultados duvidosos, sugerindo um resultado positivo para a presença de anticorpos na amostra de soro, ou seja, um falso positivo no teste.

A elaboração de um protocolo de produção viral garante qualidade ao insumo produzido e, conseqüentemente, na sorologia proposta (PRNT) (Timiryasova T.M.*et al.*, 2013).

Para confirmar os resultados obtidos na 1ª cinética, evidenciando que o MOI de 0,001 com 233.000 cel/mL apresentou resultados satisfatórios de propagação de vírus infecciosos, realizou-se uma nova cinética viral (2ª cinética). Foi confeccionada uma garrafa de 175 cm² apenas com a MOI previamente definido e foram realizadas coletas diárias de sobrenadante por 8 dias consecutivos (considerando o dia 0 pós-infecção, que significa coleta e análise do sobrenadante, imediatamente após a inoculação do vírus na garrafa) os quais foram congelados no freezer a -70°C. Para esta 2ª cinética foi avaliado apenas o perfil de infecciosidade do vírus pelo método de titulação em placa de 24 poços. Os resultados mostram propagação de vírus infecciosos no 2º dia pós- infecção, com um título de 6,63 Log₁₀, e no 3º dia um pico de vírus com o título de 7,02Log₁₀.

O MOI de 0,001 com 233.000 cel/mL na 1ª cinética mostra um pico no 2º dia de pós-infecção ser a melhor condição observada, no entanto, a produção de vírus estoque foi realizada no 3º dia pós-infecção, uma vez que, a 2ª cinética apresentou melhor título de vírus infecciosos. O lote viral produzido nestas condições teve o título de 6,76 Log₁₀ UFP/mL.

5.3. Avaliação das diferentes condições analíticas testadas na padronização do teste

A primeira abordagem realizada para definir a melhor condição analítica foi executada em um único ensaio com a participação de 5 operadores, no qual cada operador foi responsável em titular o vírus em um set de 12 placas. Cada placa correspondia a uma condição analítica distinta.

Devido às várias etapas distintas do processo e a quantidade de placas a ser processada por cada operador, essa estratégia de análise das diferentes condições analíticas não resultou em dados satisfatórios.

Observou-se que os operadores trabalharam em ritmos diferentes, refletindo, conseqüentemente, em diferentes intervalos de tempo nas incubações, comprometendo a análise na etapa de mimetização da neutralização (os intervalos pré-definidos não foram cumpridos).

Algumas placas apresentaram boa definição do fenótipo da placa de lise, independente da concentração de meio semi-sólido (CMC) utilizado, ou seja (1,5% ou 2%).

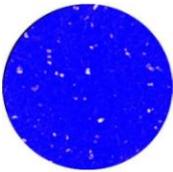
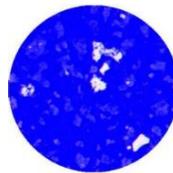
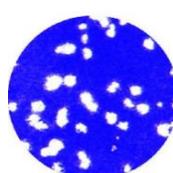
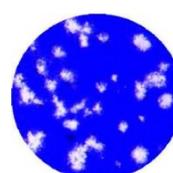
Em virtude dos resultados obtidos (dados não mostrados) realizou-se outra estratégia de análise, em que o experimento inicial foi executado de forma fragmentada, ou seja, totalizando 4 dias de experimentos distintos. Nessa abordagem utilizou-se o CMC na concentração de 1,5%, uma vez que o mesmo apresentou no 1º ensaio de padronização resultados satisfatórios quanto a definição da placa de lise. Na etapa de neutralização todas as placas foram incubadas (mimetizando a neutralização) por uma hora.

Cada figura (fotografia das placas) corresponde ao conjunto de 4 placas de 96 poços (exceto a incubação final de 2 dias, em que foram feitas 2 placas), tendo em comum as mesmas condições analíticas: 1 hora de neutralização, 3 ou 5 horas de adsorção e o uso do diluente com tampão Hepes ou com tampão bicarbonato de sódio. As placas 5 e 6 (com o intervalo de adsorção e sedimentação de 24 horas e tempo de incubação final de dois dias) foram analisadas a parte (figura 18). Os quadros mostram as imagens de resolução aproximada das placas de lise do poço de cada placa de 96 poços. O conjunto das imagens das placas de 96 poços foram avaliadas de forma qualitativa, comparando tamanho e resolução do fenótipo da placa de lise, atrelada a potência viral.

5.3.1. Determinação do tempo de incubação final

Nesta fase da padronização foram realizadas comparações de caráter qualitativo dos fenótipos das placas de lise. A escolha do melhor tempo de incubação se baseou no melhor tamanho e definição das placas de lise, de acordo com o tempo de incubação final, atrelado a potência viral. A figura 14 e o quadro 5 apresenta a condição analítica com o uso do tampão HEPES (2º diluente) com diferença apenas na incubação final.

Quadro 5 - Seleção da condição analítica do teste (2º diluente/ HEPES), a partir do tempo de incubação final. Cada orifício corresponde uma placa de 96 poços representada na figura 14, que corresponde: placa 1 (2 dias de incubação final), placa 7 (3 dias de incubação final), placa 11 (4 dias incubação final) e placa 15 (5 dias incubação final). N → tempo de neutralização, ADS → tempo de adsorção e sedimentação celular.

Condição analítica	Placas	Incubação final (dias)	Imagens dos poços
1 N.;3 ADS.; HEPES	1	2	
	7	3	
	11	4	
	15	5	

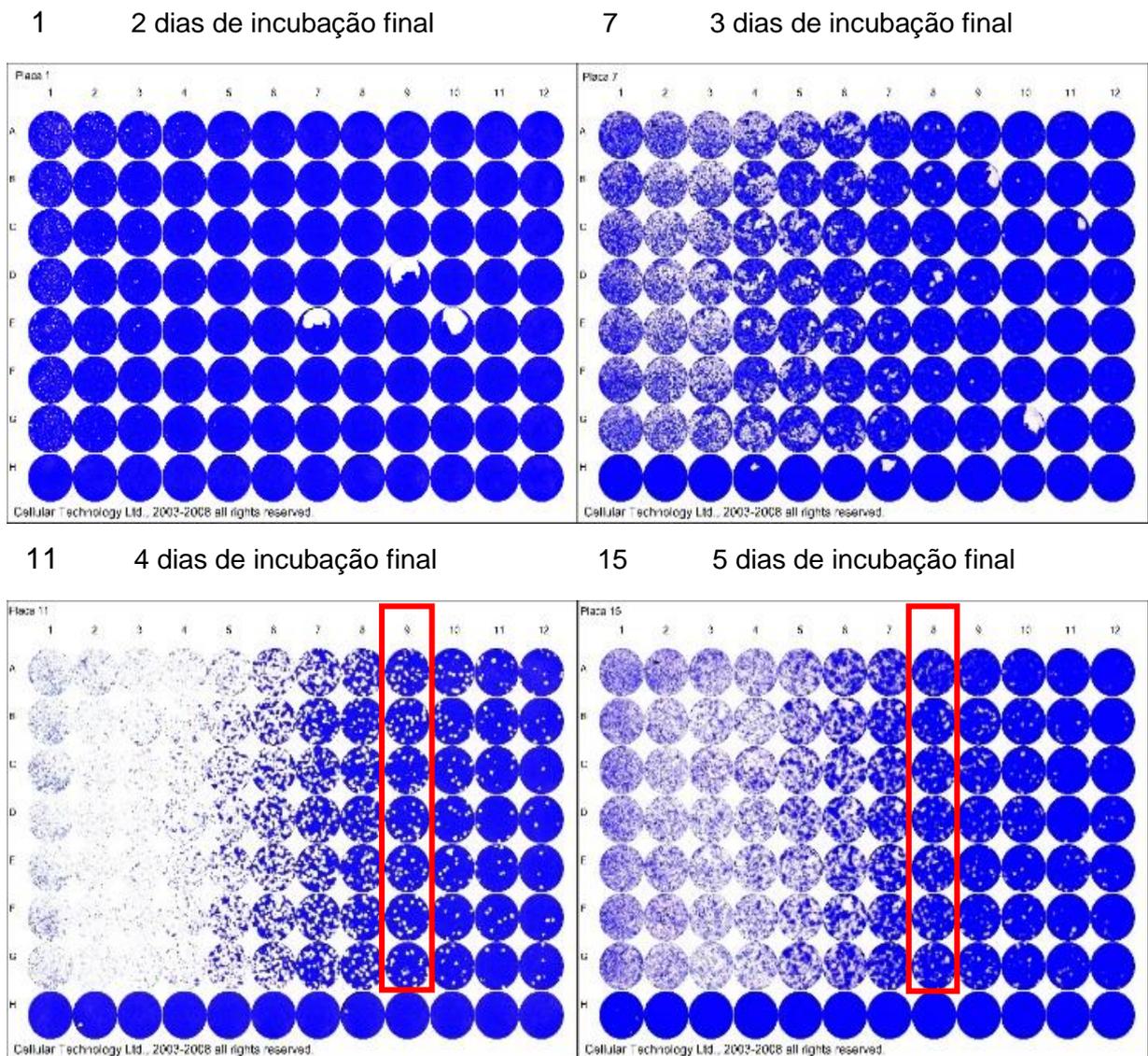


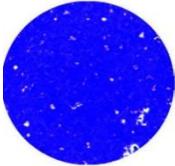
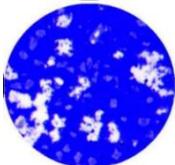
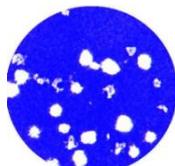
Figura 14 - Determinação do tempo de Incubação com 2º diluente: As placas possuem mesma condição analítica com diferentes dias de incubação final. Placa 1: 2 dias, Placa 7: 3 dias; Placa 11: 4 dias; Placa 15: 5 dias. A linha vermelha das placas 11 e 15, delimita a coluna (correspondente a diluição do vírus) passível de contagem das placas de lise.

Como podemos observar no quadro 5, o tempo de incubação final de 2 dias não foi suficiente para visualizar o efeito citopático na monocamada celular. A partir de 3 dias de incubação final, a lise celular já pode ser observada. Porém, somente com 4 dias (placa 11), o fenótipo das placas de lise demonstrou tamanho adequado à contagem. Ao avaliar a potência viral (análise qualitativa), tanto com 4 dias como o de 5 dias, a possibilidade contagem (em torno de 30 placas de lise/poço) estaria em diluições bem próximas, conforme as colunas marcadas em vermelho, como mostrado na figura 14. Apesar de, com 5 dias de incubação final não apresentar placas de lise

gigantes (quadro 5), a escolha da incubação final de 4 dias minimiza a subjetividade da contagem, uma vez que o Muv apresenta como característica a formação de sincícios, além da obtenção mais rápida de uma resposta.

O quadro 6 apresenta o segundo grupo de imagens analisadas, com a seguinte condição analítica: 1 hora de neutralização, 3 horas de adsorção e o uso do tampão bicarbonato de sódio (1º diluente), com diferença apenas na incubação final.

Quadro 6 - Seleção da condição analítica do teste (1º diluente), a partir do tempo de incubação final. Cada orifício corresponde uma placa de 96 poços representada na figura 15, que corresponde: placa 2 (2 dias de incubação final) placa 8 (3 dias de incubação final), placa 12 (4 dias incubação final) e placa 16 (5 dias incubação final). N → tempo de neutralização, ADS → tempo de adsorção e sedimentação celular.

Condição analítica	Placas	Incubação final (dias)	Imagens dos poços
1N.;3 ADS.; Bicarbonato de sódio	2	2	
	8	3	
	12	4	
	16	5	

Como observado no quadro anterior, o tempo de incubação final de 2 dias não foi suficiente para visualizar o efeito citopático na monocamada celular (quadro 6). A partir de 3 dias de incubação final, a lise celular já pode ser observada. Novamente, com 4 dias de incubação final (placa 12), o mesmo apresenta melhor definição do

fenótipo de placa de lise. Outro fator importante desta análise, é que o fenótipo das placas de lise (análise qualitativa) foi indiferente quanto ao uso dos dois diluentes (tampão HEPES quanto ao tampão Bicarbonato de sódio). O mesmo se observa com relação a potência viral, ou seja, com 4 ou 5 dias de incubação final, a possibilidade de contagem das placas de lise (30 placas de lise/poço) está em diluições bem próximas, conforme as colunas marcadas em vermelho como mostrado na figura 15.

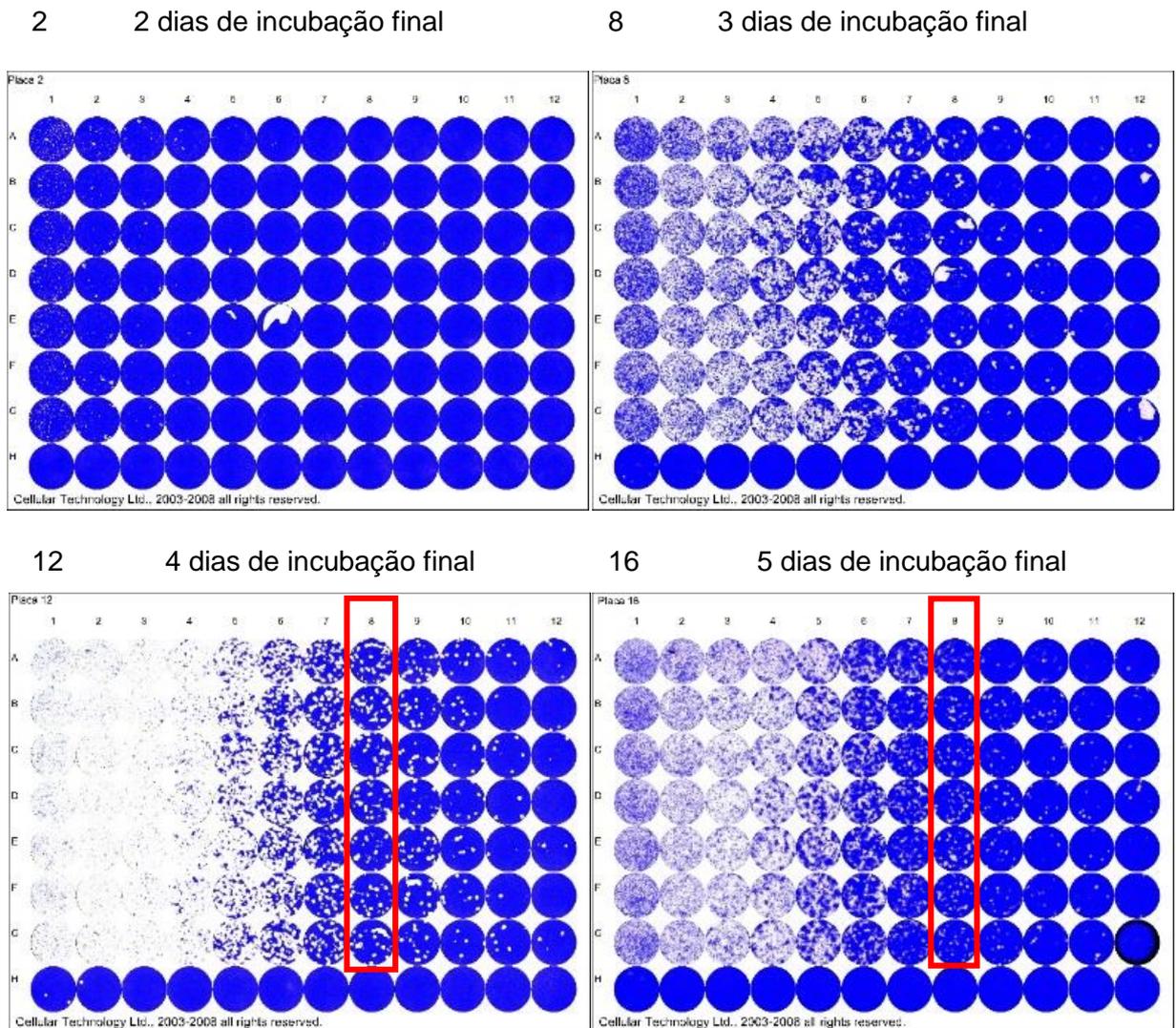


Figura 15 - Determinação do tempo de incubação com 1º diluente. As placas possuem a mesma condição analítica com diferenças na incubação final. Placa 2: 2 dias; Placa 8: 3 dias, Placa 12: 4 dias; Placa 16: 5 dias. A linha vermelha das placas 12 e 16, delimita a coluna (correspondente a diluição do vírus) passível de contagem das placas de lise.

5.3.2. Determinação do tempo de adsorção

Para esta análise foram avaliados três tempos de adsorção: 3 horas (quadro 6, figura 15), 5 horas (quadro 7, figura 16) e 24 horas de adsorção (quadro 9, figura 18). As condições analíticas que não apresentaram potencial de melhora no teste foram avaliadas a parte (como por exemplo, tempo de adsorção de 24 horas, que seria mais laborioso e não representou nenhum incremento ao teste). O quadro 7 representa o grupo de imagens com as seguintes condições analíticas: 1 hora de neutralização, 5 horas de adsorção e o uso do 2º diluente (tampão HEPES), com diferentes dias de incubação final.

Quadro 7 - Seleção da condição analítica do teste a partir do tempo de adsorção de 5 horas com 2º diluente. Cada orifício corresponde uma placa de 96 poços representada na figura 16, que corresponde: placa 3 (2 dias de incubação final) placa 9 (3 dias de incubação final), placa 13 (4 dias incubação final) e placa 17 (5 dias incubação final). N → tempo de neutralização, ADS → tempo de adsorção e sedimentação celular.

Condição analítica	Placas	Incubação final (dias)	Imagens dos poços
1 N.; 5 ADS.; HEPES	3	2	
	9	3	
	13	4	
	17	5	

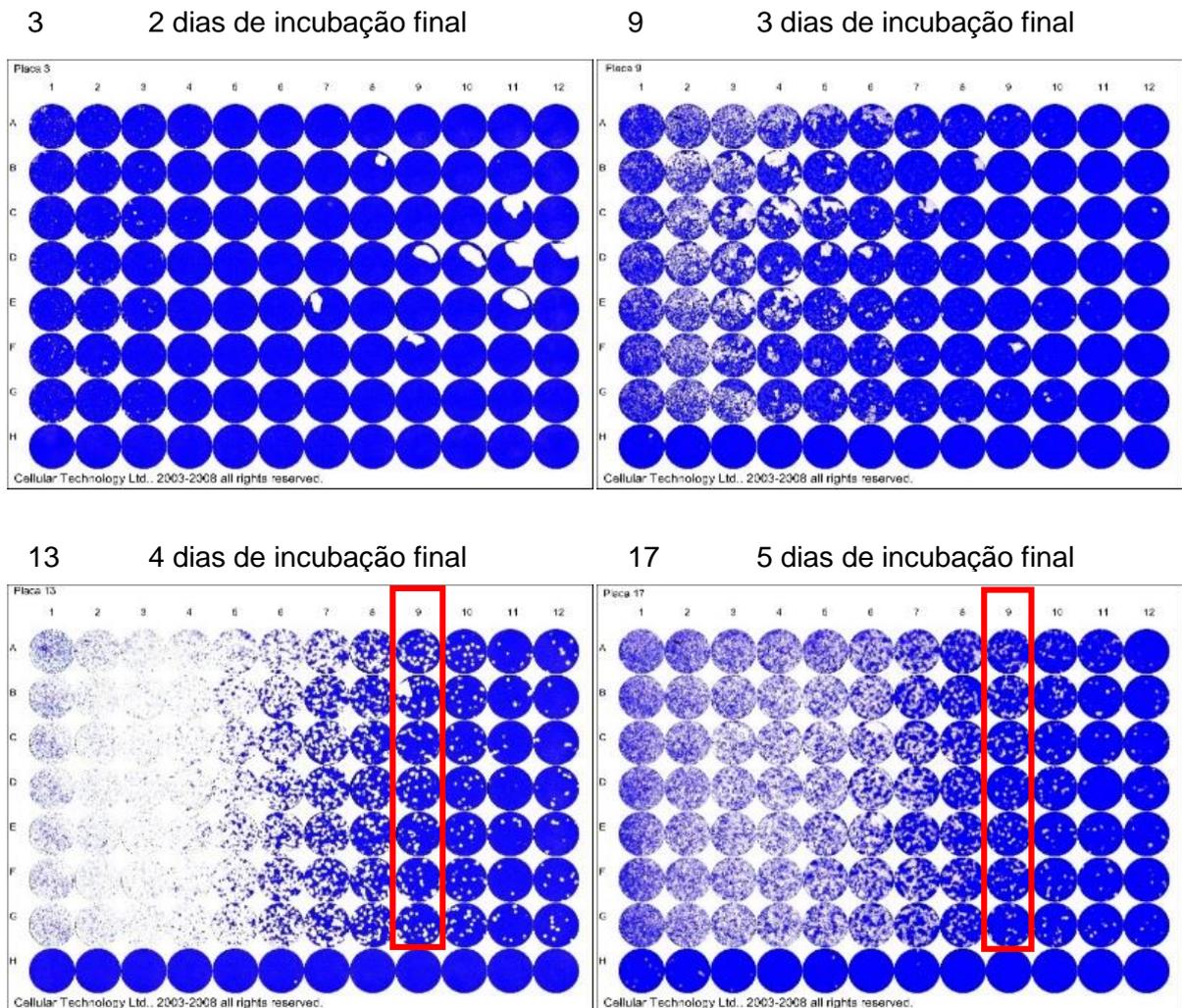
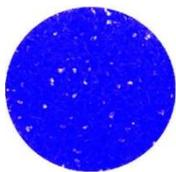
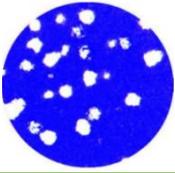


Figura 16 - Determinação do tempo de adsorção com o 2º diluente. As placas possuem a mesma condição analítica com diferentes tempos de incubação final. Placa 3: 2 dias; Placa 9: 3 dias; Placa 13: 4 dias; Placa 17: 5 dias.

As imagens fotográficas das placas de lise revelam o mesmo padrão de resposta observado nas análises realizadas com relação ao tempo de incubação final, ou seja, o intervalo de 5 horas de adsorção com 2 dias de incubação final, ainda é inferior ao necessário para visualizar a lise da monocamada celular. Com 3 dias de incubação final as placas de lise começam a ser observadas, mas somente com 4 dias de incubação final (placa 13) (quadro 7), o efeito citopático desejado é alcançado. O mesmo se observa com relação a potência viral, ou seja, com 4 ou 5 dias de incubação final, a possibilidade de contagem das placas de lise (30 placas de lise/poço) está em diluições bem próximas, conforme as colunas marcadas em vermelho como mostrado na figura 16.

Portanto, não se justificaria o aumento do tempo de adsorção de 3 horas para 5 horas, pois não ocorre nenhuma mudança na qualidade do fenótipo da placa de lise, e nem no aumento da potência do vírus. A mesma análise também foi realizada na presença do 1º diluente (tampão Bicarbonato de sódio) (quadro 8, figura 17 e quadro 6, figura 15).

Quadro 8 - Seleção da condição analítica do teste a partir do tempo de adsorção de 5 horas com 1º diluente. N → neutralização, ADS → adsorção e sedimentação celular.

Condição analítica	Placas	Incubação final (dias)	Imagens dos poços
1 N.;5 ADS.; Bicarbonato de sódio	4	2	
	10	3	
	14	4	
	18	5	

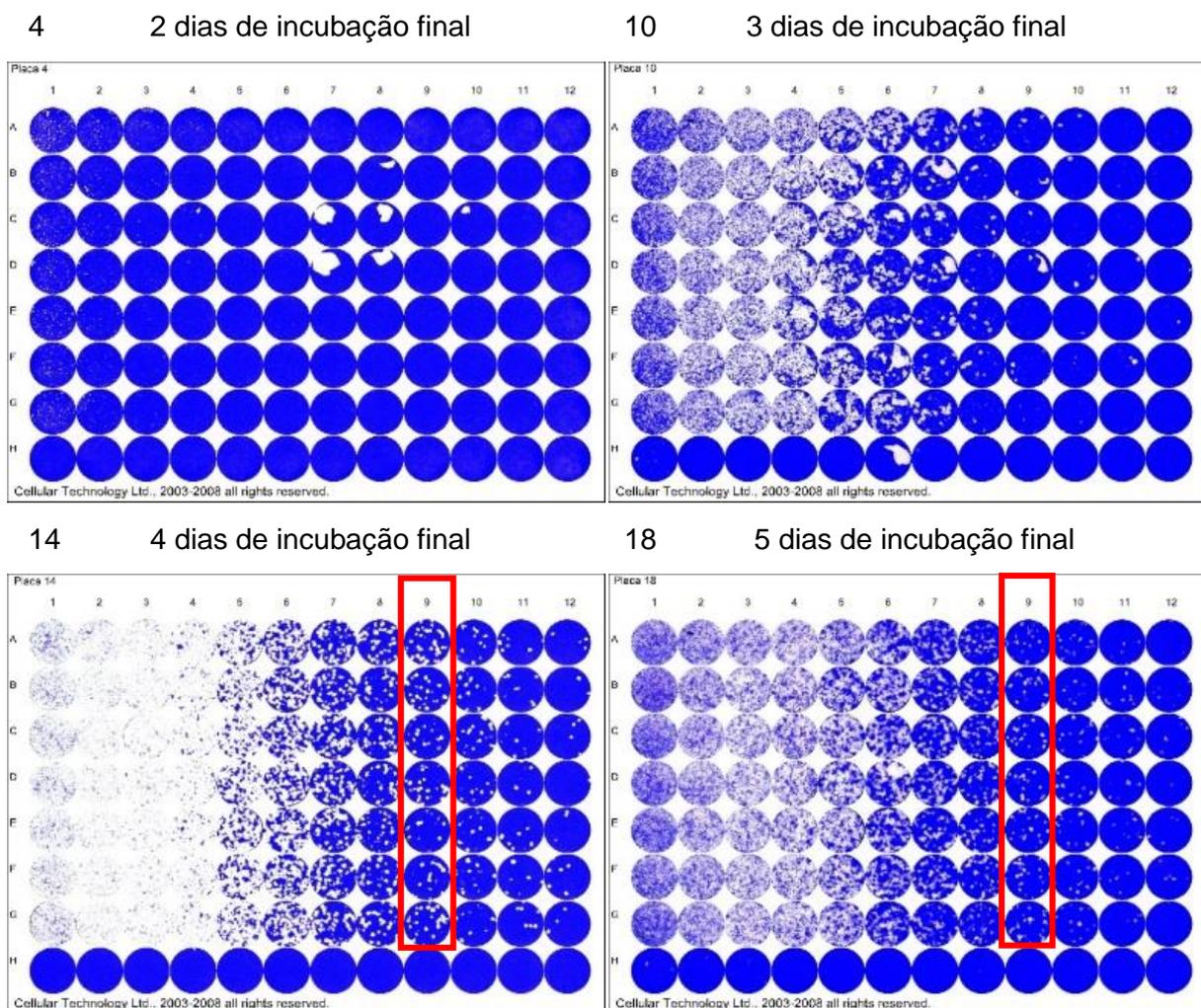


Figura 17 - Determinação do tempo de adsorção com o 1º diluente: As placas possuem a mesma condição analítica com diferentes tempos de incubação final. Placa 4: 2 dias; Placa 10: 3 dias; Placa 14: 4 dias; Placa 18: 5 dias.

As imagens mostram o mesmo perfil de qualidade fenotípica da placa de lise, semelhante ao observado com o uso do 2º diluente. O mesmo se observa com relação a potência viral, ou seja, com 4 ou 5 dias de incubação final, a possibilidade de contagem das placas de lise (30 placas de lise/poço) está em diluições bem próximas, conforme as colunas marcadas em vermelho.

A última análise do tempo de adsorção foi com o período de 24 horas e com incubação final de 2 dias. Para esta análise também foi avaliado o uso do 1º e 2º diluentes (figura 18).

2 dias de incubação final

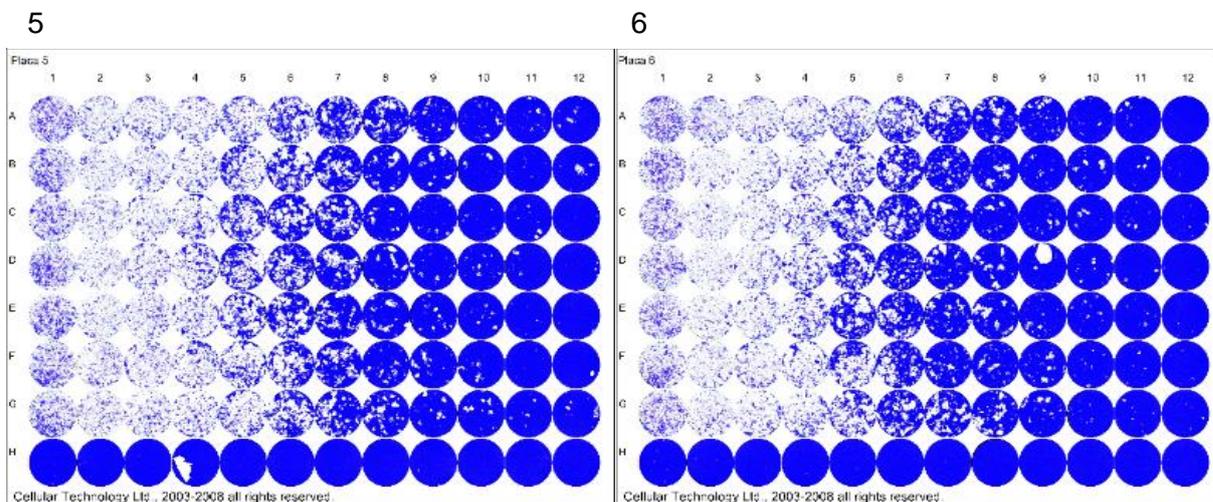
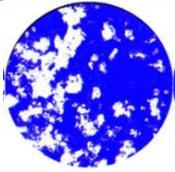


Figura 18 - Determinação do tempo de adsorção com o 1º e 2º diluente. As placas possuem mesmo tempo de incubação final, com diferenças nos tampões utilizados. Placa 5: 2º diluente (com HEPES); Placa 6: 1º diluente (com bicarbonato de sódio).

Quadro 9 - Seleção da condição analítica do teste a partir do tempo de adsorção de 24 horas com 1º diluente e 2º diluente. Com 2 dias de incubação final, N → neutralização, ADS → adsorção e sedimentação celular.

Condição analítica	Placas	Incubação final (dias)	Imagens dos poços
1 N.;24 ADS.; HEPES	5	2	
1 N.;24 ADS.; Bicarbonato de sódio	6	2	

Os resultados referentes às placas 5 e 6 (com 24 horas de adsorção e diluente formulado com HEPES e com bicarbonato de sódio, respectivamente), como mostra a figura 18, não refletiram num aumento considerável na potência viral. Com relação as placas de lise, as mesmas apresentaram contornos disformes e irregulares, dificultando a contagem.

Frente aos diferentes tempos de adsorção testados e sedimentação celular (3, 5 e 24 horas), o tempo de 3 horas foi escolhido já que os demais não mostraram incremento nem na potência do vírus, nem no delineamento e definição das placas de lise que justificassem a alteração de protocolo. As incubações finais de 2, 3, 4 e 5 dias impactam diretamente na formação da placa de lise, ou seja, no tamanho e definição.

No que diz respeito a incubação final de 2 dias, seja com tempo de adsorção e sedimentação celular de 3 ou 5 horas, observou-se a formação da placa de lise, mas de tamanho muito reduzido; o que significa que não houve tempo suficiente do vírus fazer o efeito citopático de maneira que pudesse ser visualizada. Por sua vez, a incubação final de 2 dias com 24 horas de adsorção (avaliada a parte) foi capaz de evidenciar o efeito citopático, porém com contornos irregulares nas bordas da placa de lise, o que dificulta a resolução do teste.

5.3.3. Definição da condição analítica para o teste

Para determinar qual condição analítica que melhor define o fenótipo da placa de lise no menor intervalo de tempo possível foram selecionadas as 4 placas de 96 poços correspondentes às diferentes condições analíticas (3h ou 5h de adsorção; diluente com HEPES ou Bicarbonato) com tempo de incubação final de 4 dias, já que este intervalo apresentou o melhor fenótipo (quadro 10).

Em cada uma destas placas foram contadas 7 réplicas de vírus e calculadas as respectivas médias (de cada placa de 96 poços) na diluição mais próxima de 30 placas de lise/poço (*input* de vírus desejado para o teste).

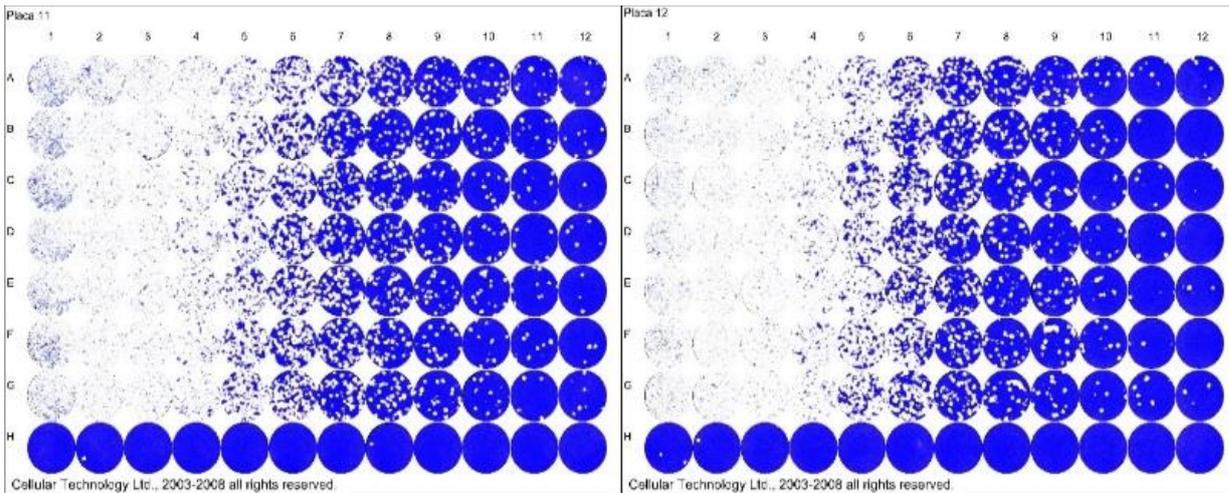
Quadro 10 - Diferentes condições analíticas do teste a partir do tempo de incubação final de 4 dias. Com o uso dos 2 diluentes e 3 ou 5 horas de adsorção, representadas na figura 19: N → neutralização, ADS → adsorção e sedimentação celular.

Condições analíticas	Solução semi sólida	Placas
1 N.; 3 ADS.; HEPES	1,5% CMC	11
1 N.; 3 ADS.; Bicarbonato de sódio		12
1 N.; 5 ADS.; HEPES		13
1 N.; 5 ADS.; Bicarbonato de sódio		14

4 dias de incubação final

11

12



13

14

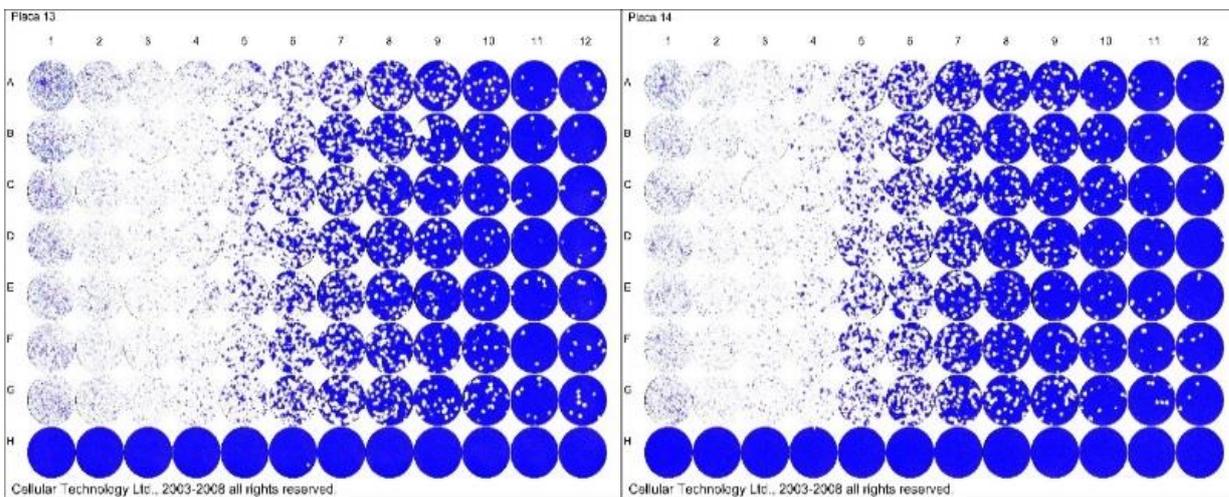


Figura 19 - Comparação entre as diferentes condições analíticas no tempo de incubação final escolhido (4 dias). Placa 11: 3h de adsorção e diluente com Hepes; Placa 12: 3h de adsorção e diluente com bicarbonato; Placa 13: 5h de adsorção e diluente com Hepes; Placa 14: 5h de adsorção e diluente com bicarbonato.

A partir da contagem das 7 réplicas do vírus na coluna 8 (diluição viral de 1:1280) da placa 12 foi obtida a média de 29,7 placas de lise (figura 20). A placa 12 foi eleita por apresentar melhor custo/benefício em relação a solução tampão utilizada (bicarbonato de sódio) e o tempo de adsorção reduzido de 3 horas. As placas 11, 13 e 14 (figura 19), apresentaram na diluição 1:2560 (uma diluição posterior a de 1:1280) médias de contagens de placas de lise em torno de 30 (dados não mostrados).

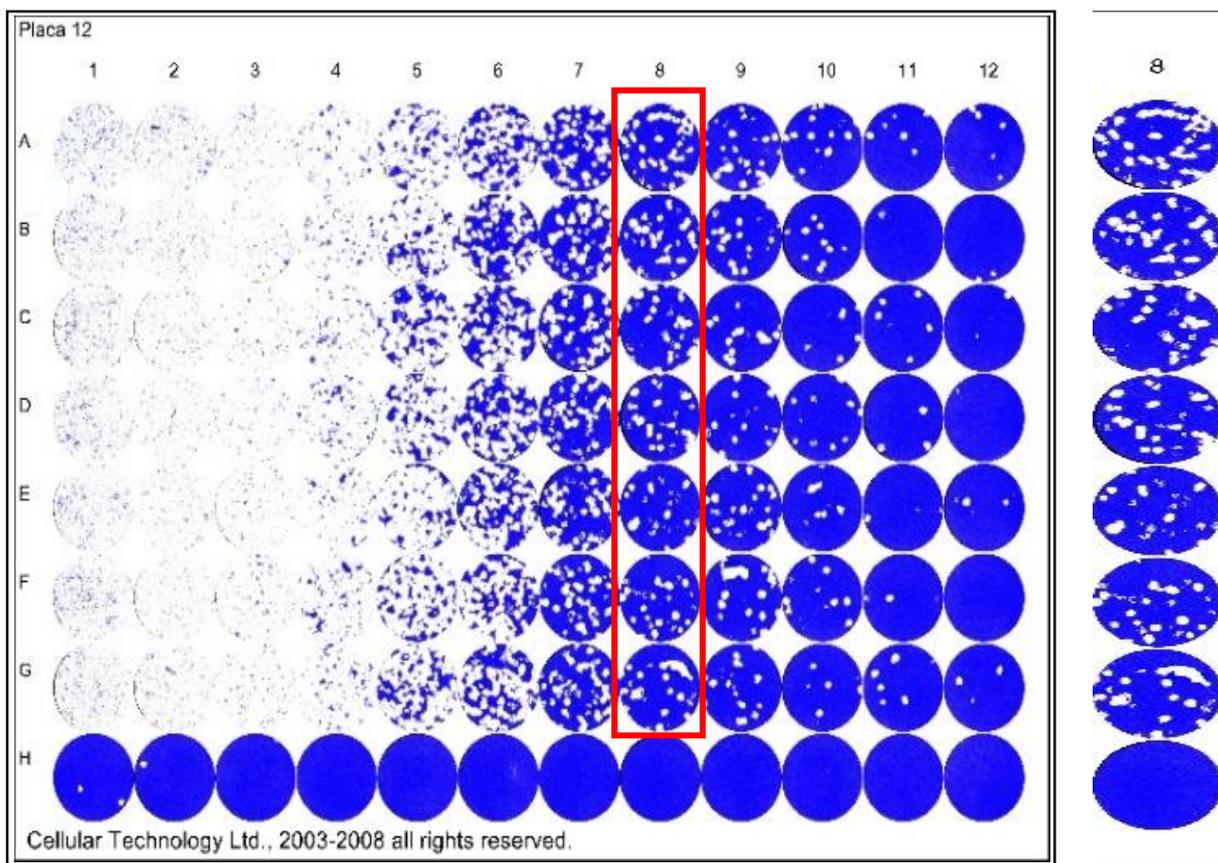


Figura 20 - Determinação da faixa de diluição do vírus da placa 12: O lado A representa a foto da placa de 96 com vírus diluído a partir de 1:10 até 1: 20480. Cada diluição seriada do vírus (colunas de 1-10) foi dosada em 7 réplicas. As colunas 7, 8 e 9 são colunas que apresentam quantidades de placas de lise passíveis de contagem, sendo que a coluna 8 foi eleita para a contagem. O lado B é a foto aproximada da coluna 8 (1:1280) eleita para a contagem das placas de lise.

Portanto, a condição analítica selecionada na padronização foi a referente a placa 12, correspondente à 1 hora de neutralização, 3 horas de adsorção, diluente com tampão bicarbonato de sódio e incubação final de 4 dias.

Os resultados mostraram que o vírus não sofre diminuição ou aumento da potência, o que sugere que o tamponamento por HEPES não influenciou na adesão e fusão das proteínas de superfície do envelope viral com a membrana plasmática, embora, tenha sido observado no momento da manipulação do vírus nas placas de 96 poços, alterações visuais de coloração no diluente, uma vez que a solução de bicarbonato de sódio somente tem efeito de tamponamento na presença contínua de CO₂.

Durante o manejo das placas de 96 poços, o operador adiciona e dilui os soros nas placas, sem que haja controle de pH nessa etapa do processo. Completada a diluição seriada adicionasse o vírus e incubava em estufa de CO₂. Isso poderia impactar na infecciosidade do vírus, mas conforme os dados aqui apresentados, os mesmos não indicaram diferenças no fenótipo e na concentração viral, que justificasse a necessidade do uso do tampão citado, apesar de outros autores utilizarem na formulação do diluente para os testes de neutralização, a solução HEPES de pH 7,4 (Latner D. R. *et al.*, 2014).

Dados da literatura elucidam que as proteínas de superfície do envelope viral podem alterar o seu estado conformacional, independente de pH e promover a internalização do vírus na célula. Na maioria dos *Paramyxoviridae* isso ocorre na presença de pH fisiológico e para os *rubulavírus* ocorre em pH baixo (Morrison T. G., 2003; Chang A. & Dutch R. E., 2012).

Assim, durante a padronização do PRNT para caxumba, desenvolvido no nosso laboratório, o HEPES não impactou positiva ou negativamente na concentração viral.

5.3.4. Avaliação do período de incubação viral e determinação da diluição viral

A partir da escolha da condição analítica (placa 12) com o menor intervalo de tempo possível (4 dias), pode-se determinar a diluição favorável para obtenção de, aproximadamente, 30 placas de lise/poço: diluição 1:1280. A partir desta diluição foram testadas uma diluição acima (1:2560) e uma abaixo (1:640) para avaliar a reprodutibilidade e confirmar a diluição viral a ser utilizada nos ensaios subsequentes. Paralelamente, estes ensaios foram realizados com etapa de “neutralização” (mimetizando neutralização) de 1h e 2h em estufa de CO₂ a 37°C com objetivo de avaliar a interferência do período incubação sob o vírus. Suspensões virais de cada diluição-teste (1:640; 1:1280; 1:2560) foram analisadas em 32 réplicas em cada ensaio, totalizando 3 ensaios independentes.

O ensaio com a suspensão viral preparada na diluição de 1:640 não teve como ser quantificado, uma vez que apresentou alta concentração viral, inviabilizando a contagem da mesma.

Os resultados analisados são as médias das contagens obtidas (quantidade de placa de lise por poço) das suspensões virais (1:1280 e 1:2560) dos três ensaios

distintos realizados. A diferença dos tempos de incubação foi analisada através da comparação das médias das contagens de cada suspensão viral preparada nas diluições citadas, as quais foram comparadas entre si. Para a análise dos dados foram formuladas as seguintes hipóteses:

H0: $\mu_1 = \mu_2$. As médias aritméticas (MA) das contagens das suspensões virais submetidas a 1 e 2 horas de incubação são iguais;

H1: $\mu_1 \neq \mu_2$. As médias das contagens das suspensões virais submetidas a 1 e 2 horas de incubação não são iguais.

De acordo com a figura 21 não foi observado diferença significativa entre as médias das contagens das placas de lise nos ensaios com 1 ou 2 horas de “neutralização” para as diferentes suspensões virais testadas.

A suspensão viral 1:1280 não apresentou diferenças entre as médias globais das contagens das placas de lise entre os dois tempos de “neutralização” citados, 1 hora (MA=32,823) e 2 horas (MA=33,385), $t = -0,6012$, p-valor = 0,5485, com 95% de intervalo de confiança (-2.4082; 1.2832). Estes resultados não rejeitam a hipótese nula, ou seja, as suspensões virais submetidas a 1 ou 2 horas de “neutralização” apresentaram resultados iguais.

O mesmo resultado foi constatado quando avaliando a suspensão viral diluída 1:2560, ou seja, as médias globais das contagens das placas de lise entre os dois tempos de “neutralização”, 1 hora (MA=22,365) e 2 h (MA=21,490), $t = 1,1865$, p-valor = 0,2369, com 95% de intervalo de confiança (-0,57971; 2,32971). Estes resultados também não rejeitam a hipótese nula, sendo considerados iguais.

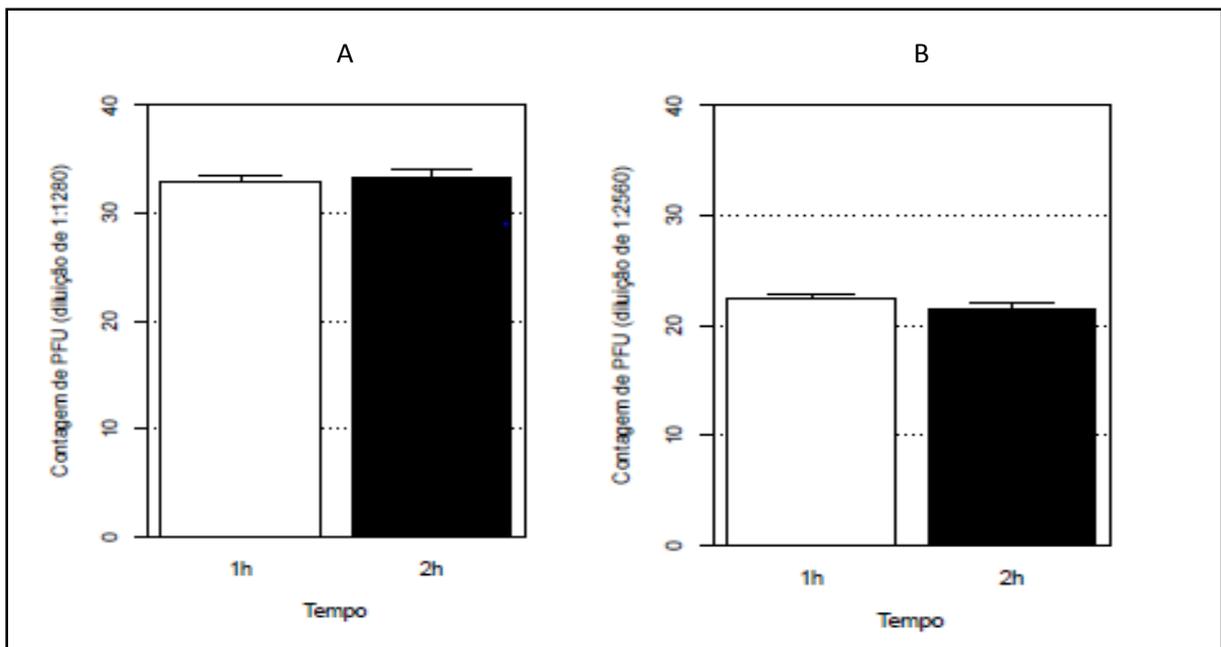


Figura 21 - Comparação entre 1 e 2 horas de “neutralização” para cada suspensão viral: Ambos os gráficos A e B apresentam duas colunas (branca: 1 hora; preta: 2 horas), representativas das médias das contagens das suspensões virais preparadas nas diluições de 1:1280 e 1:2560, respectivamente. A barra de erro padrão da média tem os seguintes valores: Gráfico A: 0.69994 (1 hora) e 0.62097 (2 horas). Gráfico B: 0.54795 (1 hora) e 0.49360 (2 horas).

A partir da constatação da igualdade dos valores obtidos nas duas suspensões virais, o passo seguinte foi estimar pelo método matemático de regressão linear, a diluição para obter 30 placas de lise/poço. O quadro 10 apresenta a diluição de 1:1600 calculada a partir da média global de cada diluição viral (1:1280 e 1:2560), sendo submetidas à 1 hora de incubação (protocolo original) já que as os diferentes tempos de “neutralização” não impactaram nos resultados.

Quadro 11 - Base de dados para a determinação da diluição viral para obter 30 placas de lise/poço. Cada ensaio (1, 2, 3), representa a média da contagem das placas de lise dos 32 poços de cada diluição avaliada. A média global representa todos os ensaios de cada diluição.

Diluição	Média				Regressão linear
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Global	Diluição viral para 30 placas de lise/poço
1: 1280	37,8	26,9	33,8	32,8	~1:1600
1: 2560	26,9	19,7	20,4	22,3	

5.3.5. Análise da interferência dos intervalos de neutralização de 1 e 2 horas na ligação vírus-anticorpo

Ao definir a diluição viral de 1:1600, o passo seguinte foi avaliar possíveis impactos nos títulos de anticorpos quando um soro é submetido a 1 e 2 horas de neutralização. Para este ensaio foi utilizado um soro padrão positivo denominado MAX, o qual foi dosado 20 vezes em placas de 96 poços. Este mesmo procedimento foi realizado nas duas condições analisadas (placas idênticas): neutralização por 1 hora ou 2 horas. Esse ensaio foi repetido em dois dias distintos, totalizando 40 observações. Para as análises foram descritas as seguintes hipóteses.

De acordo com as hipóteses formuladas:

H0: $\mu = 0$. O soro padrão submetido a 1 e 2 horas de neutralização apresenta títulos de anticorpos iguais;

H1: $\mu \neq 0$. O soro padrão submetido a 1 e 2 horas de neutralização não apresenta títulos de anticorpos iguais.

Os resultados apresentados no gráfico 2 mostraram diferença significativa nas médias dos títulos de anticorpos neutralizantes entre os dois grupos avaliados, 1 hora

(MA=19,812) e 2 horas (MA=32,261) onde a diferença encontrada foi igual a -12.448, sendo $t = - 8,8375$, $p \leq 0,01$ e intervalo de confiança de 95% (-15,2974; -9,5991). Dessa forma pode-se rejeitar a hipótese nula atribuída ao teste. Isso nos fornece evidências, de que a neutralização por um maior intervalo de tempo, ou seja, de 2 horas, aumenta o título de anticorpos presentes no soro testado, conforme demonstrado no gráfico 2. Em relação ao soro negativo, não foram observadas diferenças de títulos entre dois grupos avaliados, mantendo seu título na recíproca da primeira diluição do teste (1:x = 15) (dados não mostrados).

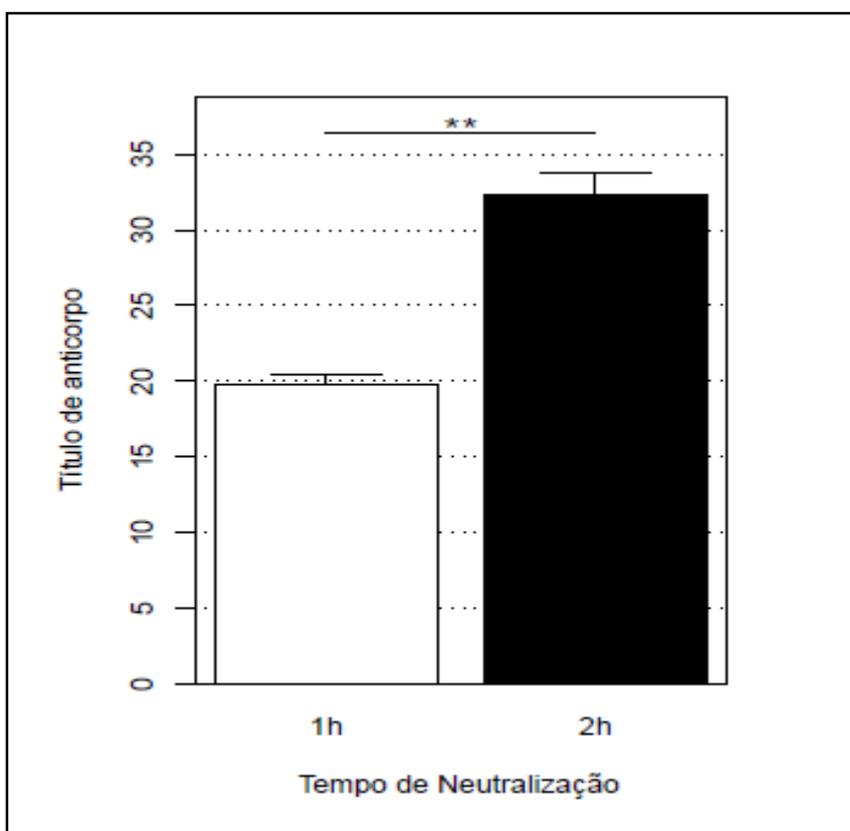


Gráfico 2 - Avaliação do intervalo de tempo de neutralização com soro padrão positivo. Barra branca: média dos resultados do soro padrão positivo com 1 hora de neutralização Barra preta: média dos resultados do soro padrão positivo com 2 horas de neutralização. O Barra de erro padrão para grupo de 1h de neutralização: 0,67. Para o grupo 2h: 1,45. ** representa p-valor $\leq 0,01$.

O aumento observado no título dos anticorpos no ensaio com duas horas de neutralização nos sugere que este seja o melhor tempo a ser empregado no teste.

Entretanto, segundo alguns autores variações de até três vezes nos títulos de anticorpos em ensaios com a mesma condição analítica são aceitáveis, podendo ser uma variação intraensaio e interensaio, uma vez que o PRNT é um ensaio biológico, e como tal é passível de variações nos seus resultados (Cohen *et al.*, 2007; Simões, 2011).

Estudos voltados ao desenvolvimento de novas estratégias de construção de vacinas para a dengue elucidam a importância do mapeamento dos epítomos de antígenos de interesse para entender o mecanismo de reconhecimento e ligação dos anticorpos e assim construir vacinas mais eficazes ao seu propósito. Trabalhos recentes elucidam a influência do arranjo conformacional dos epítomos virais na acessibilidade do anticorpo (Dowd. K. A & Pierson T. C., 2011; Dowd. K. A *et al.*, 2014).

De acordo com a literatura, durante as mudanças conformacionais que ocorrem na interação vírus -célula, alguns epítomos sofrem alterações na estrutura original de acordo com o pH do meio externo (Chang A. & Dutch R. E., 2012), bem como podem ser influenciados pela temperatura a qual a partícula viral é submetida (Dowd. K. A & Pierson T. C., 2011). Dowd e colaboradores demonstraram a influência do tempo de neutralização nas ligações de vírus-anticorpo, corroborando que maiores intervalos de tempo de neutralização aumentam a probabilidade de interações entre os epítomos dos antígenos de superfície e os anticorpos (Dowd. K. A *et al.*, 2014).

Estes resultados nos permitem especular a necessidade de um intervalo de tempo de neutralização maior para favorecer as reações de formação do complexo antígeno-anticorpo também no caso do vírus da caxumba.

No presente estudo não houveram análises para avaliar a influência da temperatura na potência do vírus e nem no título do soro. No entanto, os dados demonstraram que quando submetido aos diferentes tempos de “neutralização” (mimetizando a neutralização), o vírus não perdeu sua potência. Mas as análises dos dados dos tempos de neutralização real (ensaio com vírus-anticorpo), o tempo de neutralização de 2 horas mostrou um aumento significativo nos títulos do soro padrão positivo.

A avaliação dos diferentes intervalos de neutralização *in vitro* no teste de PRNT para o vírus da caxumba nos fornece informações relevantes que possibilitam uma maior acurácia na detecção e quantificação de anticorpos neutralizantes.

5.4. Determinação do Ponto de corte para o teste

A definição do ponto de corte do teste foi realizada a partir da curva ROC considerando o índice de Youden. A curva ROC foi construída comparando-se os resultados dosados pelo ensaio de Elisa com os títulos obtidos no ensaio de PRNT. Esta análise permitiu definir o melhor valor de ponto de corte que classifica as respostas positivas e negativas no PRNT, considerando os parâmetros de especificidade e sensibilidade.

Dos 300 soros amostrais (pré e pós vacinados), apenas 146 (73 pré e 73 pós vacinação) puderam ser dosados pelo PRNT, pois algumas amostras se mostraram inadequadas ao teste.

Foram utilizadas para as análises estatísticas 126 amostras de soro. As demais amostras foram excluídas, pois não tinham resultados ou apresentavam resultados indeterminados no teste de ELISA.

O ponto de corte foi estimado em $>22,95$ de título de anticorpos neutralizantes, considerando todos os pontos possíveis da curva. Este valor é o que mais equilibra a sensibilidade (95,7%) com a especificidade (97,5%) no teste, dentro do grupo amostral avaliado (gráfico 3).

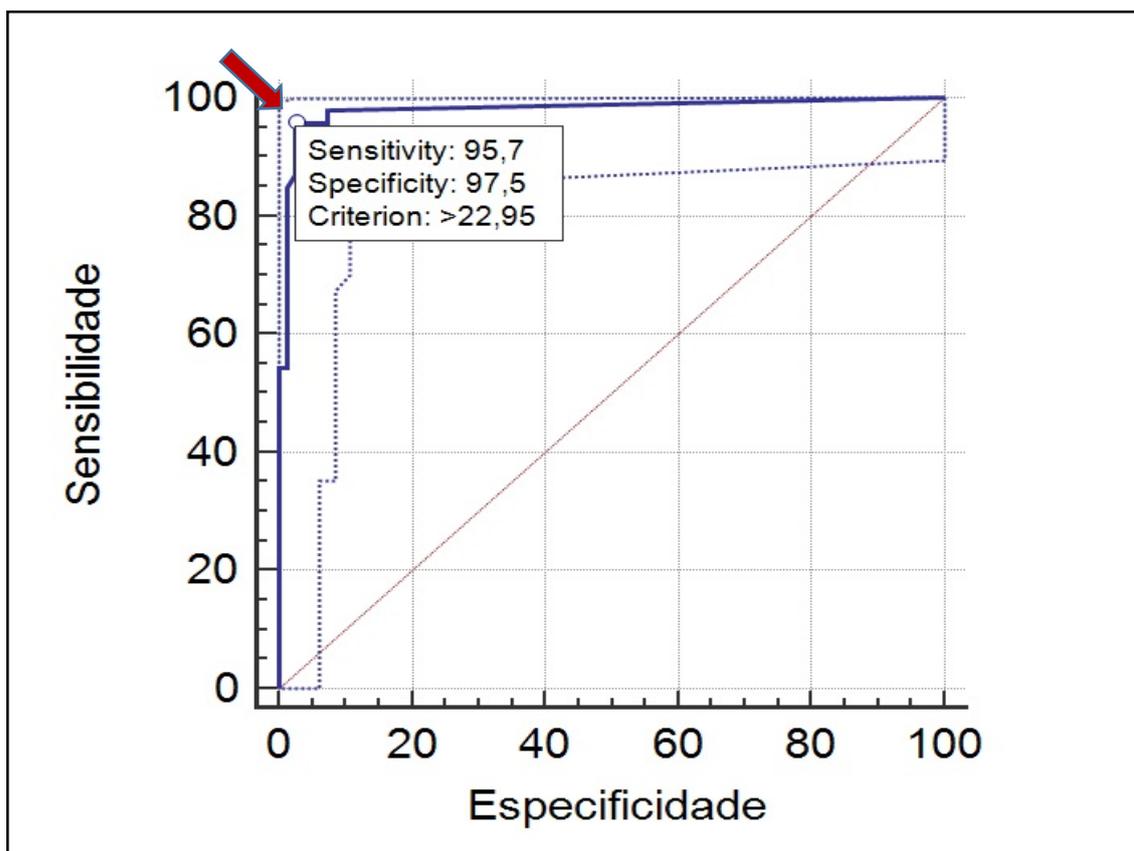


Gráfico 3 - Curva ROC construída com 126 soros testados por PRNT e ELISA. A área sob a curva, que indica a acurácia, determinada pelo índice de Youden foi igual a 0,980 (98%). O círculo branco (seta vermelha) representa o ponto de corte de >22,95, com 95,7% de sensibilidade e 97,5% de especificidade.

De acordo com a tabela 3, os resultados apontam que a área sob a curva de 95,8% evidencia boa exatidão global do teste. Segundo o manual do *MedCalc Statistical*, quando a área sob a curva apresenta resultado de 50%, isso resulta na sobreposição da distribuição dos valores dos dois grupos avaliados, ou seja, não permite uma boa distinção de pré e pós nos testes de diagnósticos.

Tabela 3 - Análise da curva ROC na performance do PRNT na detecção de anticorpos neutralizantes para caxumba

Indice	PRNT
AUC	0,980
Intervalo de confiança de 95 % para a AUC	0,938 - 0,997
Sensibilidade (%)	95,65
Intervalo de confiança de 95 % para a sensibilidade	85,2 - 99,5
Especificidade (%)	97,50
Intervalo de confiança de 95 % para a especificidade	91,30 - 99,7
Cutoff ótimo	>22,95
Razão de verossimilhança positiva	38,26
Razão de verossimilhança negativa	0,045

AUC: Área sob a curva

A razão de verossimilhança indica em quantas vezes o resultado de um teste diagnóstico é capaz de mudar a probabilidade de se ter uma doença (Jaeschke *et al.*, 1994). A razão de verossimilhança positiva é definida como a chance do resultado positivo vir a diagnosticar a verdadeira presença de anticorpos neutralizantes por PRNT, e não um resultado falso. Esta apresentou valor igual a 38,26, isso equivale a dizer que a chance do resultado positivo ser diagnosticado como verdadeiro positivo é 38,26 vezes de ser verdadeiro, do que esse diagnóstico representar um resultado falso positivo. A razão de verossimilhança negativa apresentou valor igual a 0,089, ou seja, a chance do resultado negativo vir a diagnosticar a verdadeira não presença de anticorpos neutralizantes por PRNT é 0,045 vezes de ser verdadeiro, do que esse diagnóstico representar um resultado falso negativo.

De acordo com ponto de corte definido pela curva ROC, podemos observar os resultados de títulos de anticorpos neutralizantes para ambos os testes. Ao comparar tais resultados (tabela 4), evidenciamos a quantidade de amostras e seus respectivos valores percentuais apontando os títulos positivos e negativos.

Tabela 4 - Tabela comparativa dos 126 resultados analisados de ambos os testes

Resultados ELISA/PRNT	Número de Amostras	% do total
PRNT ⁺ /ELISA ⁺	44	35,00
PRNT ⁻ / ELISA ⁻	77	61,00
PRNT ⁻ / ELISA ⁺	2	2,40
PRNT ⁺ / ELISA ⁻	3	1,60
Total	126	100

De acordo com os dados da tabela 4, podemos interpretar os resultados como: 35% (44/126) das amostras dosadas de ambos os testes apresentam resultados equivalentes, ao qual podemos classificar como verdadeiros positivos. Da mesma maneira, 61% (77/126) das amostras negativas para ambos os testes, por sua vez, podem ser classificadas como verdadeiros negativos. Com relação aos resultados positivos e negativos, 2,4% (2/126) das amostras foram negativas para o PRNT e positivas para ELISA, ao passo que apenas 1,6% (3/126) das amostras foram positivas para o PRNT e negativas para o ELISA.

O gráfico 4, dispõe esses mesmos resultados apresentados na tabela 4, demonstrando a concordância e discordância dos resultados nos referidos testes de diagnósticos.

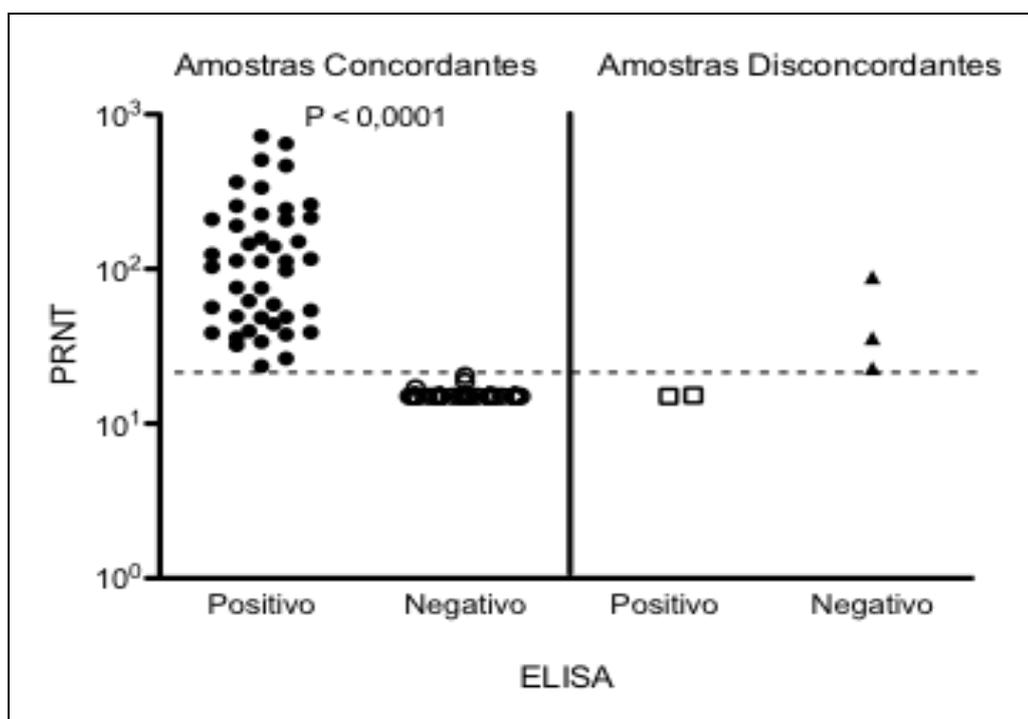


Gráfico 4 - Representação gráfica dos resultados concordantes e discordantes dos dois testes. No eixo X estão todos os resultados de ELISA classificados como positivo e negativo. No eixo Y estão todos os valores de títulos de PRNT expressos em Log_{10} . A linha tracejada representa o ponto de corte $> 22,95$ do teste PRNT. $P < 0,0001$, teste Mann-Whitney.

A partir dos resultados observados, pode-se considerar uma prevalência de positividade para a real presença de anticorpos neutralizantes (que confirmem a existência da doença) de 35% com relação ao grupo amostral estudado. Dessa forma pode-se estimar valores preditivos positivos e valores preditivos negativos no teste.

Tabela 5 - Valores preditivos positivos e negativos do PRNT

PRNT	
Valor preditivo positivo (%)	95,373
Intervalo de confiança de 95%	84,45 – 99,41
Valor preditivo negativo (%)	97,680
Intervalo de confiança de 95%	91,63 – 99,74

O valor preditivo positivo de 95,37% representa a probabilidade de que a doença estava presente quando o teste é positivo, e o valor preditivo negativo de 97,68% representa a probabilidade de que a doença não estava presente quando o teste é negativo, considerando o ponto de corte 22,95.

Os resultados obtidos através da curva ROC permitiram estabelecer de forma mais concisa um ponto de corte para o teste, com base nos parâmetros de sensibilidade e especificidade. Para isso, foi necessário um painel de soros de crianças pré e pós vacinadas com a tríplice viral e que tinham sido dosadas sorologicamente pelo teste ELISA (Santos E. M. *et al.*, 2014).

Dados obtidos na curva de calibração (discutidos a seguir) evidenciam que o soro padrão (reconhecidamente positivo) quando diluído teve o limite mínimo de detecção de anticorpos neutralizantes próximo ao ponto de corte (título em recíproca da diluição= 21). Sendo assim, o ponto de corte estabelecido contemplaria o mínimo de detecção de anticorpos.

Para realizar as análises propostas pela curva ROC foi necessário categorizar os títulos como positivo ou negativo para ambos os testes de diagnósticos (PRNT/ELISA), sendo o ELISA considerado como teste de referência.

O teste ELISA apresenta maior sensibilidade do que especificidade na detecção de anticorpos quando comparado ao PRNT (Mauldin *et al.*, 2005). Além disso, o ELISA pode apresentar respostas cruzadas, ou seja, de outros anticorpos induzidos por outros antígenos que se liguem aos antígenos do vírus da caxumba (Ticher A., 2007; CDC, 2012). Mas os dados apresentados na tabela 4 não refletem este cenário, indicando um baixo percentual observado de amostras discordantes: 2,4% (2/126) de amostras positivas por ELISA e negativas por PRNT (gráfico 4).

A curva ROC é uma ferramenta analítica adotada por diversos autores (Rocha E. S. O *et al.* 2012; Simões, 2011). Esse modelo de análise para determinar um ponto de corte através da curva ROC indica dentre vários pontos que o teste produz, aquele valor que equilibra sensibilidade e especificidade (Martinez E. Z., 2003).

De acordo com o protocolo do laboratório, o ponto de corte era definido a partir da soroconversão obtida na primeira diluição do teste, ou seja, imediatamente acima da recíproca da diluição de 15 (considerando o valor da diluição final). Esse ponto de corte representava uma incerteza nas respostas, uma vez que, por ser um ensaio biológico, que possui como característica a variabilidade intrínseca, poderia acarretar consequentemente na categorização de resultados falsos positivos.

Portanto, a proposta deste trabalho foi definir um ponto de corte que pudesse atender todas as chances possíveis de evidenciar à presença de anticorpos neutralizantes, independente do uso da vacina, dando maior poder de diagnóstico, ou seja, apresentando um resultado realmente positivo para a presença de anticorpos neutralizantes.

Dentro do grupo amostral (126 soros) foram avaliados a razão de verossimilhança, valores preditivos e a classificação de positivos e negativos no teste, com base na definição ponto de corte $>22,95$. Contudo, estes cálculos não refletem por completo a real circunstância (variabilidade) ao qual os resultados podem apresentar (negativo e positivo) no teste, que possui características biológicas; uma vez que o mesmo pode fornecer valores de títulos diferentes em um mesmo soro. Essas variações nos resultados são aceitas em até três vezes, quando dosados em um mesmo ensaio ou em ensaios independentes (Cohen *et al.*, 2007, Kelsoe M. S., 2014).

Em virtude disso, conforme é definido para o teste ELISA, estabelecemos faixas interpretativas para o teste PRNT, permitindo assim a classificação de um determinado resultado ser denominado como realmente positivo. Portanto, para os valores de títulos que estiverem próximos ao ponto de corte de 22,95 (~ 23), estes serão considerados indeterminados. Esse tipo de classificação permitiu caracterizar um intervalo considerado como “zona cinza” para que soros que apresentarem resultados dentro desse intervalo, sejam novamente avaliados. De acordo com o ponto de corte de 23 foram estabelecidas faixas interpretativas para o teste, conforme a tabela 6.

Tabela 6 - classificação dos títulos de anticorpos em positivo e negativo no teste.

Classificação dos títulos de anticorpos neutralizantes

≤ 15 a $23 \rightarrow$ títulos considerados negativos no teste.

> 23 a $50 \rightarrow$ títulos considerados indeterminados (zona cinza)

$> 50 \rightarrow$ Títulos considerados positivos

De acordo com a tabela 6, resultados com títulos de 15 a 23 serão considerados negativos para o teste PRNT. Resultados de títulos observados no intervalo de >23 a 150 serão considerados como duvidosos, sendo passíveis de reanálise.

O valor de título 50 é a delimitação máxima considerada no intervalo da zona cinza, acima deste valor os resultados serão considerados como positivos. O mesmo foi atribuído na classificação, devido ao grupo observado de pessoas que haviam sido avaliadas no estudo intitulado em: “Protocolo para a obtenção e produção de soros *in house* para testes de Neutralização por Redução de Placas de Lise (PRNT). Neste estudo, os voluntários com títulos >50 haviam informado no questionário realizado, relato de vacinação prévia ou mesmo relato da doença clínica (dados não publicados). Sendo assim, passamos a considerar este título de 50 como ponto de corte para resultados seguramente positivos.

Portanto, a partir dessa abordagem formulou-se um fluxograma de decisões (Figura 22) para uma reanálise (caso o título seja observado nos intervalos de 23 a 50) para dar maior confiabilidade do resultado, ou seja, classificando-os com maior poder de precisão os resultados realmente positivos ou negativos no teste.

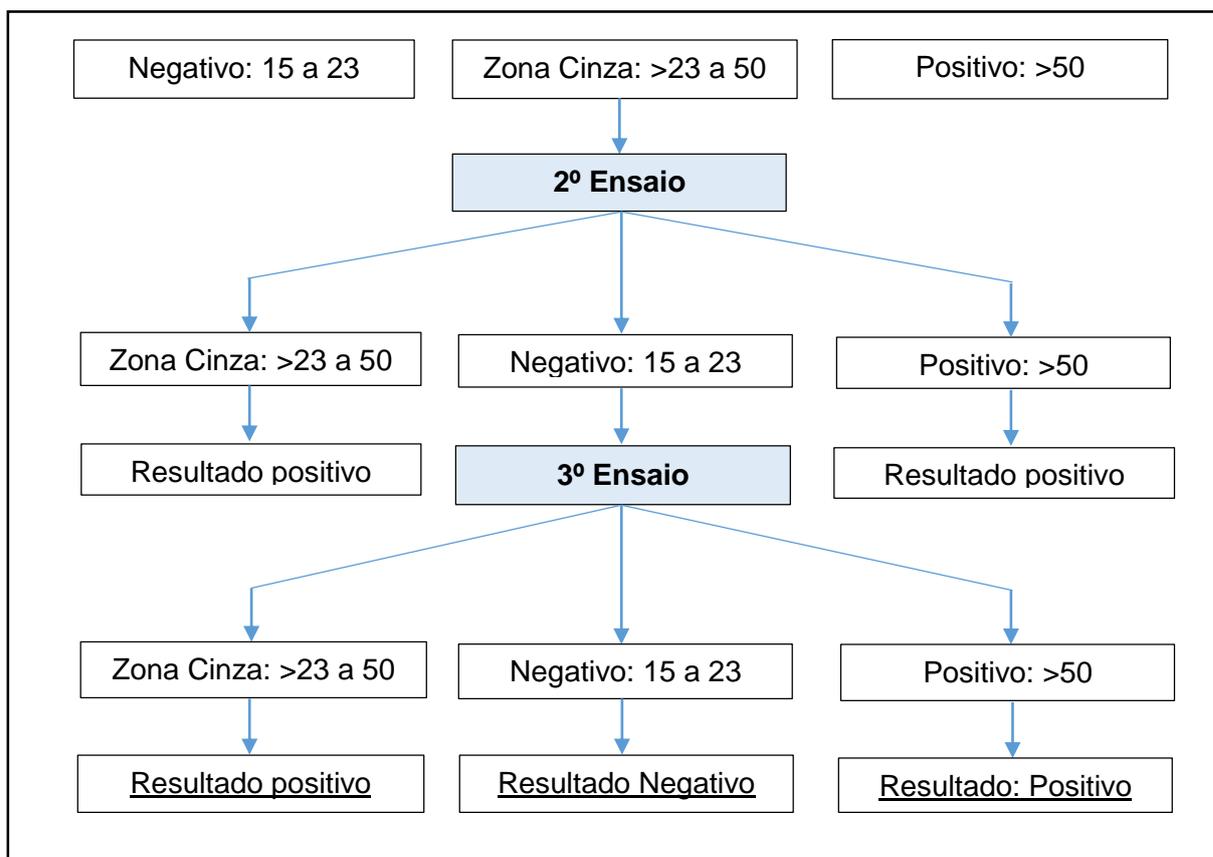


Figura 22 - Fluxograma de interpretação do resultado do ensaio de PRNT para caxumba.

5.5. Critérios de aceitação do teste

5.5.1. Determinação dos critérios de aceitação e valor nominal dos padrões

Os soros padrões internos positivos (*in House*), foram dosados 10 vezes num ensaio, em três ensaios distintos, totalizando em 30 dosagens de cada padrão. Os padrões estudados foram categorizados como: negativo, baixo, médio e alto, conforme o título de anticorpos neutralizantes, obtidos de ensaios anteriores pela técnica empregada no laboratório antes desta dissertação (dados não mostrados). Os mesmos foram dosados pelo PRNT padronizado, e a média dos resultados avaliados com intervalo de confiança de 95%. Os dados estão representados no quadro abaixo.

Soro baixo		Soro médio	
alfa	0,05	alfa	0,05
dp	44,52	dp	119,40
n	30,00	n	30,00
média amostral	96,11	média amostral	396,13
erro	15,93	erro	42,73
limite inferior	80,18	limite inferior	353,40
limite superior	112,04	limite superior	438,85
Soro alto		Soro negativo	
alfa	0,05	alfa	0,05
dp	224,14	dp	5,62
n	30,00	n	30
média amostral	1723,31	média amostral	19,26
erro	80,20	erro	2,01
limite inferior	1643,11	limite inferior	17,25
limite superior	1803,51	limite superior	21,27

Figura 23 – Determinação do valor nominal de cada soro padrão. Cada bloco corresponde ao intervalo de confiança (95%), da média dos títulos de cada soro padrão: baixo, médio, alto e negativo. O alfa: nível de significância, dp: desvio padrão, n: número amostral, erro: erro padrão da média amostral, limite inferior e superior: faixa intervalar.

O valor nominal de cada padrão é a média dos títulos observados nas 30 dosagens realizadas em três ensaios distintos. O soro baixo apresenta título de 96,11, com 95% de intervalo de confiança (80,18 - 112,04), o soro médio com título de 396,13, com 95% de intervalo de confiança (353,40 - 438,85), o soro alto com título de 1723,31, com 95% de intervalo de confiança (1643,10 - 1803,51) e o soro negativo com o título de 19,26, com 95% de intervalo de confiança (17,27 - 21,27).

Mas esses cálculos não consideram a variabilidade do teste, portanto, realizamos uma abordagem matemática que define melhor essa variação, estimando em até quantas vezes os soros padrões podem oscilar no teste.

Os resultados apresentados na tabela 7 foram definidos pela razão do maior valor de título de anticorpos dividido pelo menor valor de título observado dentro do espaço amostral de 30 observações de cada soro padrão testado.

Tabela 7 - Variações obtidas de cada soro padrão avaliado.

Variação dos controles	
Soro baixo	4,8 vezes
Soro médio	3,5 vezes
Soro alto	1,4 vezes
Soro negativo	2,4 vezes

Como mostra a tabela 7 foram observadas diferentes variações entre os padrões. Com isso podemos identificar de forma mais representativa quantas vezes os resultados podem variar no teste. A maior variação observada foi nos resultados do padrão baixo e a menor variação foi nos resultados do soro alto. O que nos indica que, quanto maior a concentração de anticorpos no soro, menor será a dispersão dos resultados, ou seja, variação. Em especial, o soro padrão negativo, oriundo de primata não humano é determinante na concepção de real valor negativo, uma vez que a caxumba é uma doença exclusivamente humana (Galazka *et al.*; 1999; CVE, 2001).

A provável hipótese atribuída para a variação de 2,4 vezes entre os títulos de anticorpos do soro negativo, pode ser pelo fato de que esse macaco ao ser necropsiado e submetido à punção cardíaca, poderia ter ocorrido alguma intervenção, no momento do procedimento e ocasionado à hemólise do mesmo. O estudo intitulado

em: - Protocolo para a obtenção e produção de soros "*In House*" para testes de Neutralização por Redução de Placas de Lise (PRNT), ainda não publicado, identificou que um grupo de soros hemolisados e não hemolisados de mesma amostra, apresentou diferenças nos valores de títulos. Sendo o soro hemolisado apresentando valores de títulos maiores em relação os valores de títulos no soro não hemolisado.

Esses resultados apresentados são preliminares, uma vez que os valores estão dentro de um espaço amostral de apenas 30 dosagens. A execução de novos ensaios no decorrer das atividades de rotina no laboratório permitirá um número maior de observações dos soros padrões, o que permitirá maior refinamento nas análises, corroborando com os dados obtidos neste estudo.

5.5.2. Critérios de aceitação para o controle viral

Para determinar a faixa de variação aceitável do vírus, às 951 réplicas dos controles virais de todos os ensaios realizados no presente estudo foram avaliadas através de um histograma de frequência, atribuindo um intervalo, permitindo estabelecer um valor mínimo e máximo de contagens no controle viral do teste para todas às vezes que o mesmo é diluído 1:1600 e utilizado nos testes de rotina no laboratório.

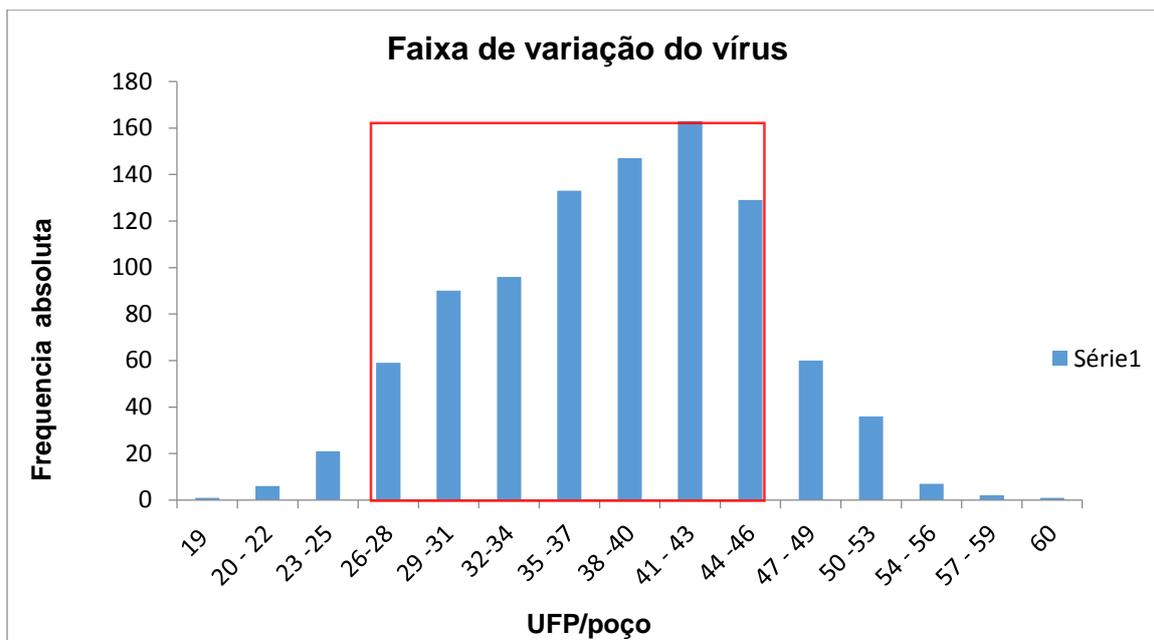


Gráfico 5 - Histograma de frequência absoluta de todos os controles virais dos ensaios realizados. O eixo x a frequência das observações e o eixo Y o número de UFP/mL. A linha vermelha é demarcação das contagens para traçar a faixa de variação do vírus.

O histograma analisado (gráfico 5) apresenta as diversas contagens de placas de lise/poço das réplicas dos controles virais de todos os ensaios realizados no presente estudo.

De acordo com a frequência observada delimitou-se a faixa de 26 a 44 (*End point* de 13 a 22) como critério de aceitação do teste.

Os critérios de aceitação do controle viral do teste PRNT foi instituído em estudo anterior pelo laboratório para atribuir qualidade aos ensaios realizados para Febre amarela (Simões, 2011).

A faixa estipulada para o PRNT de febre amarela foi estabelecida entre 20 e 40 placas de lise/poço (*End point* de 10 a 20), ao avaliar o desempenho do teste de neutralização para a febre amarela em placa de 96 poços (Simões, 2011). A justificativa para isso é que a contagem inferior ao estabelecido pode influenciar na sensibilidade de detecção, pois há pouca quantidade de vírus para evidenciar as respostas. Ao passo que, se houver contagens acima da faixa estipulada, aumenta a subjetividade da contagem do vírus, uma vez que a circunferência do poço da placa de 96 é de tamanho reduzido.

No caso do vírus caxumba, o mesmo ainda não havia sido avaliado até este trabalho. Observou-se que o limite máximo para a contagem das placas de lise é de 44/poço, pois valores acima aumentam a subjetividade da contagem, pelo fato do vírus formar placas de lise gigantes (sincícios) (Morrison T. G., 2003; Chang A. & Dutch R. E., 2012), influenciando na confluência das mesmas.

Os critérios de aceitação para o controle viral garantem qualidade ao resultado final, mas não deve ser considerado isoladamente para anular um teste. Deve-se associar a outros critérios de aceitação (padrões internos), de forma a considerar válido ou não o ensaio como um todo.

5.6. Validação

5.6.1. Curva de calibração

A curva de calibração foi realizada com diluições seriadas de uma amostra considerada alta oriunda do estudo intitulado Protocolo para a obtenção e produção de soros “*In House*” para testes de Neutralização por Redução de Placas de Lise (PRNT). Esta amostra foi escolhida por possuir um título de anticorpos neutralizantes alto suficiente para ser diluído e representar no mínimo 6 pontos para estabelecer uma curva padrão. Após a diluição deste soro e este foi analisado dentro do ensaio de PRNT e observamos que a partir da diluição 1:128 o mesmo não era mais capaz de ser quantificado, pois não neutralizava mais o vírus (quadro 12).

A curva de calibração permitiu definir 5 concentrações distintas (CQA, CQB, CQD, CQM e LIQ) necessárias a validação. As mesmas, posteriormente foram utilizadas para avaliar os parâmetros de precisão intracorrída e intercorrída e a exatidão intracorrída e intercorrída do teste.

Conforme preconizado pela RDC 27 da ANVISA foram realizados três ensaios distintos para contemplar a curva de calibração. O preparo das amostras foi a partir da diluição seriada de 1:2 até 1:1024, utilizando um soro padrão *in house* SIH161 (Alto), que contém níveis altos de anticorpos neutralizantes (dados não mostrados).

Os títulos observados de cada amostra foram definidos a partir da média das 5 réplicas dosadas de cada. O quadro 11 apresenta os títulos obtidos de cada amostra referente a cada curva de calibração calculados em log.

Quadro 12 - Títulos observados de cada amostra (diluição do soro SIH161) nas três curvas de calibração.

Amostras do soro	curva 1	curva 2	curva 3
	Título em log	Título em log	Título em log
1/2	2,90	2,89	2,80
1/4	2,77	2,58	2,68
1/8	2,32	2,34	2,29
1/16	1,69	1,94	1,96
1/32	1,69	1,51	1,63
1/64	1,40	1,26	1,34
1/128	1,18	1,18	1,18
1/256	1,18	1,18	1,18
1/512	1,18	1,18	1,18
1/1024	1,18	1,18	1,18

Quando comparamos a média de título de cada amostra das três curvas analisadas, nos indicam proximidade entre esses valores, apresentando pouca dispersão dos resultados. A partir da amostra 1:128 não foi possível observar valores de títulos que evidenciem a presença de anticorpos neutralizantes.

Ao representar graficamente esses resultados observamos uma tendência de linearidade no teste ($R^2 = 0,8588$), confirmando que os títulos observados de cada amostra são condizentes com as concentrações de anticorpos diluídos no teste, como mostra o gráfico 6.

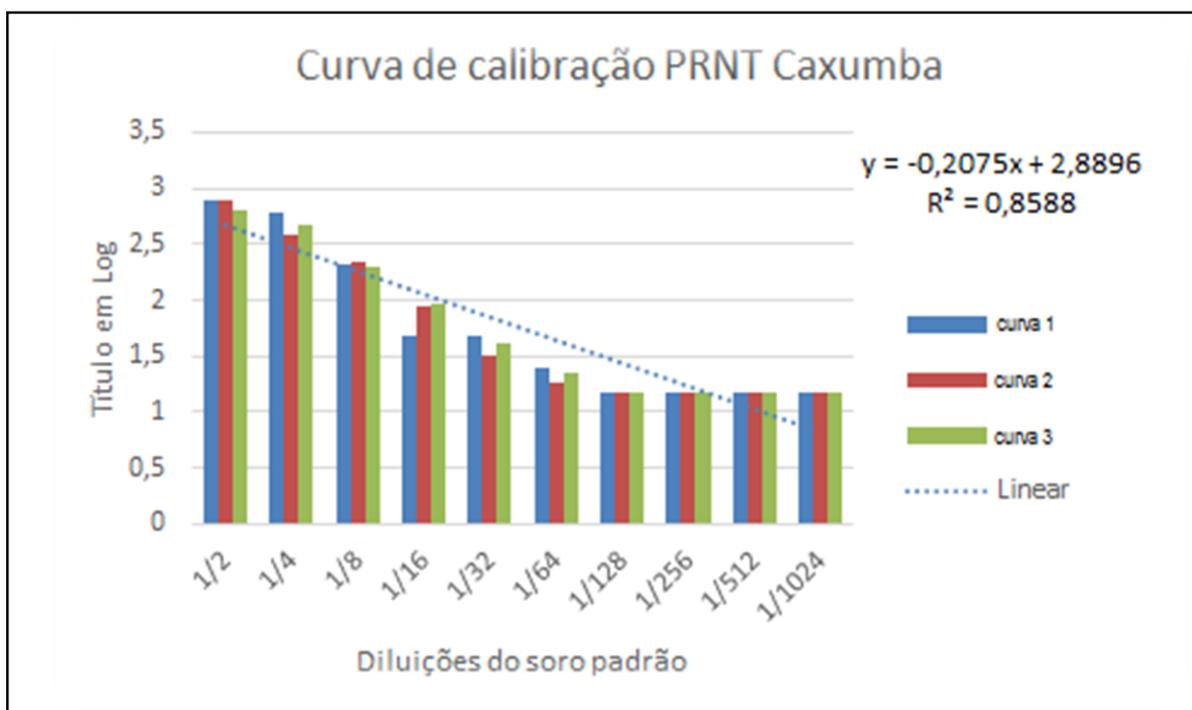


Gráfico 6: Linearidade das três curvas de calibração. O eixo Y são as diluições do soro padrão SIH161 e o eixo x são os títulos observados pelo PRNTpadronizado. A curva 1 é de cor azul, a curva 2 é de cor vermelha e a curva 3 é de cor verde.

Com base nesses resultados foi calculada a média global de cada diluição da amostra, ou seja, considerando o resultado das três curvas de calibração, de forma a contemplar as cinco concentrações determinadas pela ANVISA, como mostra o quadro 12.

Quadro 13 - Definição do valor nominal de cada concentração da curva. Média do título em \log_{10} das cinco concentrações (CQD; CQA; CQM; CQB; LIQ) determinadas nas 3 curvas de calibração no teste.

Concentrações da curva	Média das 3 curvas Log
CQD	2,9
CQA	2,6
CQM	2,3
CQB	1,7
LIQ	1,4

Conforme apresentado no quadro 12 foram determinadas as cinco concentrações da curva de calibração, descritas na RDC 27 da ANVISA.

O CQA é uma amostra de alta concentração, o CQB é uma amostra de baixa concentração, que corresponde a uma amostra com até 3 (três) vezes o limite inferior de quantificação do método (LIQ). O CQM é uma amostra de média concentração, o LIQ é uma amostra de menor concentração na curva de calibração, é o limite inferior de quantificação. O CQD que é uma amostra de controle de qualidade de diluição, que corresponde à amostra em concentração acima da maior concentração da curva de calibração (CQA).

5.6.2. Precisão e exatidão

A partir da definição das 5 concentrações foram realizados os cálculos de coeficiente de variação para avaliar o grau de dispersão entre os resultados da média global (3 curvas) de cada uma das concentrações determinadas no teste. O mesmo foi efetuado para calcular o grau de dispersão da precisão intracorrída (1 ensaio) e intercorrída (3 ensaios). Para avaliar a exatidão intracorrída (1 ensaio) e intercorrída (3 ensaios) foram calculados o erro padrão da média, a partir do título obtido de cada concentração da curva, dividido pelo valor nominal de cada uma. O quadro 13 nos mostra os resultados finais dos cálculos realizados para a precisão e exatidão.

Quadro 14 - Dados compilados da curva de calibração, precisão e exatidão do teste. Coeficiente de variação (CV) das curvas de calibração 1, 2 e 3. O CV da precisão intracorrída da curva 3 e intercorrída das curvas 1, 2 e 3. Erro padrão da relativo (ERP) da exatidão intracorrída da curva 3 e intercorrída das curvas 1, 2 e 3.

Parâmetro	Resultados em Log ₁₀			Critério de Aceitação
Curva de calibração (Recíproca da diluição)	Diluição	Título Log (média)	CV%	- CV ≤ 20% em relação à concentração nominal para a diluição do LIQ. - CV ≤ 15% em relação à concentração nominal para as demais diluições. - 75% das diluições aprovados de acordo com os critérios acima.
	1/2	2,86	1,93	
	1/4	2,68	3,55	
	1/8	2,32	1,14	
	1/16	1,87	8,10	
	1/32	1,61	5,81	
	1/64	1,34	5,27	
	1/128	1,18	0	
	1/256	1,18	0	
	1/512	1,18	0	
	1/1024	1,18	0	
	Precisão	Intracorrída (curva 3)		
CQD: 5,00 CQA: 5,89 CQM: 4,91 CQB: 3,99 LIQ: 6,84				
Intercorrída (curva 1,2 e 3)				
CQD: 4,03 CQA: 4,71 CQM: 3,20 CQB: 7,53 LIQ: 7,24				
Exatidão	Intracorrída (curva 3)			ERP ± 20% para o LIQ e ERP ± 15% para as demais concentrações
	Valor nominal	Valor avaliado	ERP%	
	CQD : 2,94	CQD : 2,79	CQD : 4,83	
	CQA : 2,63	CQA : 2,67	CQA : 1,43	
CQM : 2,33	CQM : 2,29	CQM : 1,87		
CQB : 1,73	CQB : 1,61	CQB : 6,80		
LIQ: 1,43	LIQ: 1,33	LIQ: 6,83		
Intercorrída (ERP% total, curvas 1,2 e 3)				
CQD: 2,86 CQA: 1,25 CQM: 0,83 CQB: 7,62 LIQ: 7,01				

Os resultados da precisão intracorrida e intercorrida não apresentaram valores que ultrapassassem 20% determinado pela ANVISA. O que indica pouca dispersão dos títulos calculados no teste. Com relação a exatidão foram observados valores inferiores à 20%, significando que a diferença entre o valor nominal de cada uma das 5 concentrações definidas no teste quando comparadas com o valor calculado, obtiveram-se proximidade de títulos. Os resultados demonstram que a técnica pode ser considerada apta para uso (validada).

5.6.3. Seletividade

O ensaio de seletividade é de extrema importância, pois garante que as respostas obtidas do teste são realmente direcionadas para a verificação de anticorpos específicos somente para o vírus caxumba. Neste ensaio o padrão SIH 142 positivo para caxumba e negativo para sarampo foi utilizado como soro desafiado. Os dados apresentados (figura 24) evidenciam a especificidade que o PRNT obedece.

A			B		
Seletividade/caxumba			Seletividade/sarampo		
Soro desafiado	1:x	log	Soro desafiado	1:x	log
SIH 142	173,8	2,24	SIH 142	9,7	0,99
SIH 142	151,9	2,18	SIH 142	9,7	0,99
SIH 142	132,0	2,12	SIH 142	8,2	0,91
AA61	5	0,70	AA61	5	0,70
MAX	40,2	1,60	60/12	301,6	2,48

Figura 24 - Resultados dos ensaios para avaliar a especificidade do PRNT para caxumba e sarampo. Quadro A: soro 142 apresentou títulos acima do ponto de corte do teste (<23) para caxumba. Quadro B: soro 142 apresentou títulos abaixo do ponto de corte do teste para caxumba.

De acordo com o ponto de corte de 23 e da faixa interpretativa (zona cinza >23 a 50) do PRNT de caxumba nos confirma o poder discriminatório do teste na detecção de anticorpos específicos. O teste PRNT foi otimizado de forma a proporcionar um teste mais eficiente, ou seja, de forma mais rápida e eficaz na obtenção de um resultado. Com isso foram avaliadas as etapas do processo, além de estabelecer critérios de aceitação e a determinação do ponto de corte no teste. Contudo, para atender as questões da qualidade fez-se necessário à validação do mesmo. Foram realizados os ensaios de validação de acordo com a RDC 27 da ANVISA. Para atingir esse propósito utilizamos um soro padrão positivo (que contém alta concentração de anticorpos neutralizantes) diluído de 1:2 até 1:1024 para a execução dos testes.

Dentro do escopo de validação foram definidas as cinco concentrações preconizadas pela ANVISA, que, por conseguinte foram utilizadas para avaliar a exatidão intracorrída e intercorrída, precisão intracorrída e intercorrída e linearidade do teste.

Os resultados revelam que o teste PRNT apresenta boa qualidade de diagnóstico, de forma linear e exata no que diz respeito a detecção e quantificação de anticorpos neutralizantes.

Os parâmetros exatidão e precisão são os mais abordados nos ensaios de validação nos testes biológicos. Alguns autores utilizam um painel de soros distintos, outros autores utilizam o soro padrão (Cohen *et al.*, 2007; Kelsoe S. M. *et al.*, 2014).

A proposta de avaliar um teste Viroológico, não se resume em avaliar apenas o desempenho do processo. Escopos de validação realizados por alguns autores, utilizam estratégias de análise avaliando primeiramente o perfil biológico dos componentes utilizados no teste (vírus e célula), como também na análise dos diferentes reagentes e insumos, que poderiam impactar diretamente na dinâmica das reações bioquímicas (Kelsoe S. M. *et al.*, 2014). No presente estudo, padronizamos o vírus avaliando a sua atividade biológica mediante as alterações no teste.

A seletividade nos revela que a presença de anticorpos específicos para caxumba, não reage ao vírus do sarampo. Isso nos evidencia o grau de especificidade do teste. O que é muito importante nas pesquisas clínicas direcionadas à vacina tríplice viral, que é composta de forma combinada por três antígenos virais: sarampo, rubéola e caxumba. Diferente do teste de ELISA, que obedece à reação cruzada a diversos vírus. Essa reação cruzada é devido à similaridade das proteínas HN e F presente na superfície do envelope viral de diversos vírus, que por sua vez induzem

anticorpos, que apesar de serem específicos podem reagir aos epítomos do vírus da caxumba. (CDC, 2012; P. A. Pipkin *et al.*, 1999; Mauldin *et al.*, 2005).

6. CONCLUSÃO

Ao longo dos anos muito se evoluiu nos métodos aplicados ao diagnóstico virológico. O desenvolvimento de novas vacinas ou melhorias nos processos de fabricação e formulação de vacinas existentes (tornando-as mais eficazes), instituiu métodos e técnicas cada vez mais sensíveis e rápidas na obtenção de respostas.

Dentro desse contexto, os testes de neutralização (amplamente utilizados para averiguar a eficácia vacinal) são métodos biológicos que possuem morosidade na obtenção de um resultado, e variabilidade, por se tratar de uma dinâmica de reações bioquímicas combinadas em um teste. Com isso, atualmente existe uma tendência por parte das indústrias farmacêuticas em atribuir melhorias (padronizações e validações) nessas técnicas utilizadas como ferramentas para comprovar a eficácia de um produto, seja de interesse comercial ou de atendimento à saúde pública.

A padronização envolve o entendimento desse processo biológico, permitindo melhor detalhamento na avaliação de cada etapa de execução do mesmo. Segundo o Dr. Bernad Cohen, o PRNT (técnica considerada como padrão ouro pela WHO na detecção de anticorpos para sarampo) é uma técnica laboriosa que demanda tempo na obtenção de resposta. Mas que, devido a sua importância na detecção de anticorpos neutralizantes, à melhoria na sua performance, pode promover uma técnica rápida e com resultados reprodutíveis.

Este trabalho resultou em conhecimentos e esclarecimentos sobre as etapas consideradas críticas no processo da técnica. Para tanto foi necessário estabelecer um banco de vírus de trabalho para utilizar nos testes de padronização. Com isso, foi avaliado a cinética viral determinando a melhor multiplicidade de infecção viral, e com isso estabelecendo o protocolo de produção viral, em: - MOI de 0,001 com 233.000céls/mL no 3º dia pós-infecção viral.

Posteriormente realizou-se uma sequência de ensaios com diferentes condições analíticas do teste. O conjunto de dados analisados na primeira fase do trabalho (padronização), nos revelou que o uso de solução semi-sólida de 1,5% de CMC permite melhor definição da placa de lise.

As incubações finais (1, 2, 3, 4 e 5) interferem sensivelmente na formação e no tamanho da placa de lise, com isso foi considerado o 4º dia, como o tempo de incubação final ideal. Em relação ao uso dos diluentes formulados com tampões distintos (HEPES e Bicarbonato de sódio), os mesmos não alteram a potência viral e

nem na formação da placa de lise (avaliação qualitativa). Portanto, o bicarbonato de sódio foi o tampão escolhido, por apresentar melhor custo benefício.

Com relação ao tempo de neutralização, o intervalo de 2 horas favorece na interação entre antígeno-anticorpo, definindo melhor o título de anticorpos neutralizantes do soro. Com isso definimos as condições analíticas ideais para o teste PRNT de Caxumba.

Em sequência realizamos análises estatísticas utilizando a curva ROC para determinar o melhor ponto de corte para o teste. Os valores de títulos > 23 são considerados positivos no teste. E a partir desse ponto de corte foram avaliados: AUC de 0,980, sensibilidade de 95,65, especificidade de 97,50, razão de verossimilhança positiva em 38,26, razão de verossimilhança negativa em 0,045. A partir de disso, foram determinados os valores preditivos positivos em 95,373 e valores preditivos negativos em 97,680.

Contudo, esses cálculos não são suficientes para classificar os títulos como positivos ou negativos no teste. De acordo com ponto de corte e considerando a variabilidade do teste, formulamos uma nova abordagem de classificação, estabelecendo faixas interpretativas. Com isso foram considerados valores <23 como valores negativos no teste. O intervalo de 23 a 50, como zona cinza, possibilitando uma nova avaliação dos soros, de modo a garantir maior confiabilidade dos resultados. E os valores >50 foram determinados como positivos no teste.

Posteriormente foram determinados os critérios de aceitação do teste, estabelecendo valores nominais dos soros padrões: negativo (19,26); baixo (96,11); médio (396,13) e alto (1723,31). E, a faixa de variação do controle viral (*End point*) de 13 a 22.

Após contemplar as análises propostas deste trabalho, fizemos a validação do método conforme preconizado pela RDC 27 da ANVISA, avaliando precisão, exatidão, especificidade e linearidade. O PRNT mostrou que mesmo em 3 ensaios independentes, existe uma reprodutibilidade nos seus resultados demonstrando que valores de título do soro (quando o mesmo é diluído em diversas concentrações e dosado por PRNT), apresentaram títulos condizentes ao valor esperado de cada diluição do soro (amostra). Com isso, confirmou-se a linearidade de $R^2 = 8588$, e que as variações de títulos são menores que 15%, tanto para precisão como para a exatidão. Em relação a especificidade, o PRNT não apresentou reação cruzada, ao ser avaliado com um soro padrão reconhecidamente positivo para caxumba, sendo este desafiado com vírus sarampo.

O PRNT demonstrou ser um método mais específico na detecção de anticorpos neutralizantes, sendo extremamente útil nas análises de estudos clínicos para avaliar em conjunto com outras técnicas diagnósticas a imunogenicidade de caxumba em vacina combinada.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Abbas, A. K.; Lichtman A.H.; Pillai S. Propriedades Gerais das Respostas Imunológicas. 6th. Elsevier Editora Ltda, 2008. p. 75-96.

Albrecht, P.; K. Herrmann; G. R. Burns. Role of virus strain in conventional and enhanced measles plaques neutralization test. Elsevier/North – Holland Biomedical Press. J. Virol. Methods. 1981 (3): 251-260.

Ammour Y. *et al.* Quantification of Measles, mumps and rubella viruses using real-time quantitative TaqMan-Based RT-PCR assay. J. Virol. Methods. 2012 sept 24. 187: 57-64.

Barskey A. E., Schulte C., Rosen J. B., Handschur E. F., Rausch-Phung E., Doll M. K., Cummings K. F., Alleyne E. O., High P., Lawler J., Apostolou A., Blog D., Zimmerman C. M., Montana B., Harpaz R., Hickman C. J., Rota P. A., Rota J. S., Bellini W. J., Gallagher K. M. Mumps Outbreak in Orthodox Jewish Communities in the United States. N. Engl. J. Med. 2012 Nov 1. 18 (367): 1704 – 1713.

Baxter D. Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. Occupational Medicine 2007. 57: 552-556.

Bennett AD, Modlin J, Orenstein WA, Brandling. Current status of mumps in the United States. J. Infect. Dis. 1975 jul. 132(1):106-9.

Bernard, H., Schwarz, N.G., Melnic, A., Bucov, V., Caterinciuc, N., Pebody, R.G., Mulders, M., Aidyralieva, C., Hahné, S., 2008. Mumps outbreak ongoing since October 2007 in the Republic of Moldova. Euro. Surveill. Mar 27. 13 (13): 102-104.

Bio-Manguinhos-Fiocruz - Instrução de Trabalho – IT 0746. Teste de soro-neutralização em cultura de células Vero para febre amarela e flavivírus em placas de 6 orifícios. Rio de Janeiro. 2011. p. 01-06.

Bio-Manguinhos-Fiocruz. Relatório de Atividades I. 2012. Rio de Janeiro; 2013. 59p.

Brito N.M. Junior O. P. A., Polese L., Ribeiro M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: R. ecotoxicol. Meio ambiente, Curitiba 2003. 13 dez/jan. 13:129-46.

Carbone M.K.; Rubin S. Mumps Virus. In: Knipe, David M.; Howley, Peter M. Fields Virology. 5th. Lippincott Williams & Wilkins. 2007. p. 1528 – 42.

Centers for Diseases Control and Prevention – CDC. Mumps Outbreak on a University Campus – California, 2011. [Internet] 2012 [acesso em 2013 jun. 12]; 61(48) p. 986 – 989. Disponível em: <http://cdc.mmwr/preview/mm6148a2.htm>

Chang A & Dutch RE. Paramyxovirus fusion and entry: multiple paths to a common end 2012. Viruses. Apr. 4 (4): 613-36.

Cohen B.J.*et al.* Plaque reduction neutralization test for measles antibodies: Description of a standardised laboratory method for use in immunogenicity studies of aerosol vaccination. WHO Working Group on Measles Plaque Reduction Neutralization Test. Vaccine. 2007. 1(26): 59-66.

Dowd K. A., Pierson T. C. Antibody-Mediated neutralization of flaviviruses: a reductionist view. Virology. 2011. Mar 15. 411(2): 306-315.

Dowd K. A., Mukherjee S., Kuhn R. J., Pierson T. C. Combined effects of the structural heterogeneity and dynamics of flaviviruses on antibody recognition. *J. Virol.* 2014. Oct. 88 (20):11726-37.

Elango N., Varsanyi T. M., Kovamees J. & Norrby E. Molecular cloning and characterization of six genes, determination of gene order and intergenic sequences and leader sequence of mumps virus. *J. of General Virol.* 1988. 69 (11): 2893 - 2900.

Elliott G. D., Yeo R. P., Afzal M. A., Simpson E. J., Curran J. A., Rima B. K. Strain-variable editing during transcription of the P gene of mumps virus may lead to generation of non-structural proteins NS1 (V) and NS2. *J. Gen. Virol.* 1990. 71 (Pt 7): 1555-60.

Galazka A.M., Robertson S.E., Kraigher A. Mumps and mumps vaccine: a global review. *WHO.* 1999. 77(1): 3-14.

Graham B.S.; Crowe Jr. J.E. Immunization Against Viral Diseases. In: Knipe, David M.; Howley, Peter M. *Fields Virology.* 5th. Lippincott Williams & Wilkins. 2007. p. 508-9.

Harmonised Tripartite Guideline – IHC Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Q2 (R1). [Internet]. 1996. [acesso em: 2013 out 29] p. 01-13. Disponível em:

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf.

Harrison M. S. Sakaguchi T. and Schmitt A. P. Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections 2010. *Int J Biochem Cell Biol.* Sep. 42 (9):1416-29.

Schroeder Jr H. W. & Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. J. Allergy Clin Immunol. 2010 Feb. 4 (125) suplemento 2: S41 – S52.

Hinds, L. B. A.; Rust, M. N.; Scovino A. M. Resposta do Hospedeiro às Víroses. In: Santos, N.S.O.; Romanos, M.T.V.; Wigg M.D. Introdução à Virologia Humana. 2nd. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S.A. 2008. p. 60-79.

Hirsch A. 1886. Apud Galazka A.M., Robertson S.E., Kraigher A., Mumps and mumps vaccine: a global review. WHO. 1999; 77(1): 3-14.

Hviid A., Rubin S. & Muhlemann K. Mumps. Lanc. 2008. 371: 932-44.

Imrie A., Meeks J., Gurary A., Sukhbaatar M., Truong T. T., Cropp C. B., Effler P. Antibody to dengue 1 detected more than 60 years after infection. 2007. Dec. 20(4):672-5.

International Organization for Standardization – Internacional Electrotechnical Commission 17025/ISO/IEC17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. [Internet] Geneve, Switzerland. 2005. [Acesso em 2013 jun. 12]. Disponível em: http://www.saba.org.ir/saba_content/media/image/2011/04/1821_orig.pdf

Jaeschke R. Gatyatt G. H. & Sackett D. L. User's guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. Are the results of the study valid? Jama. 1994 Feb 2. 271 (5):389-91.

Janeway Charles A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. J. Imunobiologia. 5th. Porto Alegre. Artmed, 2002. p. 21-55.

Jin L, Rima B, Brown D, Orvell C, Tecle T, Afzal M, Uchida K, Nakayama T, Song JW, Kang C, Rota PA, Xu W, Featherstone D. Proposal for genetic characterisation of wild-type mumps strains, preliminar standartisation of the nomenclature. Arch Virol 2005. Sep. 150 (9):1903-9.

Jin L, Orvell C, Myers R, Rota PA, Nakayama T, Forcic D, Hiebert J, Brown KE. Genomic diversity of mumps virus and global distribution of the 12 genotypes. Rev Med Virol. 2015 march. 2 (25): 85-101.

Kelsoe S. M., Daniell X., Todd C. A., Bilaska M., Martelli A., LaBranche C., Perez L. G., Ochsenbauer C., Rountree W., Denny T. N., Montefiori D. C. Optimization and validation of a neutralizing antibody assay for HIV - for HIV – 1 in A3R5 cells. J. Immunological Methods 2014. 409: 147-160.

Korber B., Labute M., Yusim K. Immunoinformatics comes of age. PLoS Computational Biology, San Francisco 2006. June. 6 (2): 71-78.

Latner D. R., McGrew M., Williams N. J., Sowers S. B., Bellini W. J., Hickman J. C. Estimates of Mumps Seroprevalence May Be Influenced by Antibody Specificity and Serologic Method. Clinical and Vaccine Immunol 2014. March. 3 (21): 286-297.

Liljeroos L., Butcher S. J., Matrix proteins as centralized organizers of negative-sense RNA virions. Frontiers in Bioscience 2013. Jan. 1. 18: 696-715.

Martinez E. Z., Neto F. L., Pereira B. B. A curva Roc para testes diagnósticos. Cadernos de saúde coletiva, Rio de Janeiro. 2003. 11 (1):7-31.

Mauldin J, Carbone K, Hsu H, Yolken R, Rubin S. Mumps virus-specific antibody titers from pre-vaccine era sera: comparison of the plaque reduction neutralization assay and enzyme immunoassays. *J. Clin. Microbiol* 2005. Set. 43(9): 4847-51.

Morrison T. G. Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *Biochim et Biophys Acta* 2003. Jul. 1614 (1): 73-84.

Ogbuanu I. U., Kutty P. K., Hudson J. M., Blog D., Adebisi G. R., Goodell S., Lawler J., Mclean H. Q., Pollock L. Phung E. R., Schulte C., Valure B., Armstrong G. L., Gallagher K. Impact of a Third Dose of Measles-Mumps-Rubella Vaccine on a Mumps Outbreak. *Pediatrics* 2012. Nov. 130: e1567 - e1574.

Oliveira A. R. R. Quantificação de ADN Nuclear e ADN Mitocondrial por PCR em tempo real [dissertação]. Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências de Biologia Animal; 2009.

Pipkin P.A., Afzal M. A., Heath A. B., Minor P. D. Assay of humoral immunity to mumps vírus. *J. Virol. Methods* 1999. 79:219-225.

Public Health Agency of Canada, 2007. Update on Mumps Outbreak in the Maritimes: National Summary, October 26, 2007 (acesso: 20 mai 2013. Disponível em: <http://www.phac-aspc.gc.ca/mumps-oreillons/prof-eng.php>).

Resolução - RDC 027 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA 2012.

Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/564310004b60537e891f9baf8fded4db/RDC+27+12+->

[+Valida%C3%A7%C3%A3o+de+M%C3%A9todos+Bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES](#) acesso em: 28/10/2013.

Ribani M., Bottoli C. B. G., Collins C. H., Jardim I. C. S. F., Melo L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, 2004. 27(5): 771-780.

Rocha E. S. O., Oliveira J. G., Santos J. R., Rodrigues G. O. L., Figueiredo L. B., Pessanhac J. E. M., Proietti F. A., Fonseca F. G., Bonjardima C. A., Ferreira P. C. P., Kroona E. G. Recombinant envelope protein-based enzyme immunoassay for IgG antibodies is comparable to neutralization tests for epidemiological studies of dengue infection. *J Virol Methods*. 2013 Jan;187(1):114-20.

Roehrig J. T., Hombach J. & Barrett A. D.T. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. *Viral Immunology*. 2008. 2(21): 123–132.

Rubin S. A., Link M. A., Sauder C. J., Zhang C., Nago L., Rima B. K., Duprex W. P. Recent Mumps Outbreaks in Vaccinated Populations: No Evidence of Immune Escape *J. Virol*. 2012. Jan. 86 (1):615 – 620.

Rubin S. A., Qi L., Audet S. A., Sullivan B., Carbone K. M. Bellini W. J., Rota P.A., Sirota L., Beeler J. Antibody induced by immunization with the Jeryl Lynn mumps vaccine strain effectively neutralizes a heterologous wild-type mumps virus associated with a large outbreak. *J. Infect. Dis*. 2008. Aug 15. 198 (4):508–515.

Rubin S., Eckhaus M., Rennick L. J., Bamford C. GG., Duprex W. P. Molecular biology, pathogenesis and pathology of mumps vírus. *J Pathol*. 2015. Jan. 235 (2): 242–252.

Ryu J. U., Kim E. K., Youn Y. S., Rhim J. W., Lee K. Y. Outbreaks of mumps: an observational study over two decades in a single hospital in Korea. *Korean J. Pediatr*. 2014. Sep. 57 (9): 396 – 402.

Santos C.L.S., Ishida M.A., Foster P.G., Sallum M.A.M., Benega M.A., Borges D.B., Corrêa K.O., Constantino C.R.O., Afzal M.A. and Paiva T.M.. Detection of a new mumps virus genotype during parotitis epidemic of 2006-2007 in the state of São Paulo, Brazil, 2008. *J Med Virol.* Feb. 80 (2):323-9.

Santos E.M., Silva e Sá G.R., Siqueira M.M., Martins R.de M., Camacho L.A., von Doellinger V.dos R., Maia M.de L. Immune response to the mumps component of the MMR vaccine in the routine of immunisation services in the Brazilian National Immunisation Program. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014. Jun.109 (3): 335-9.

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

Santos, N.O. S.; Romanos, M.T.V.; Oliveira, D. P. *Viroses Multissistêmicas.* In: Santos, N.S.O.; Romanos, M.T.V.; Wigg M.D. *Introdução à Virologia Humana.* 2nd. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S.A. 2008. p. 306-15.

São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde, Coordenação dos Institutos de pesquisa, Centro de Vigilância Epidemiológica “Profº Alexandre Vranjac”. – CVE. *Manual de vigilância epidemiológica caxumba e varicela. Orientações para surtos e epidemias* [Internet]. São Paulo; 2001. [acesso em 2013 out. 10]. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/resp/manu_varicax.pdf

Savage E., Ramsay M., White J., Beard S., Lawson H., Hunjan R., Brown D. Mumps outbreaks across England and Wales in 2004: observational study. *BMJ* 2005. May 14. 330 (7500):1119–1120.

SCHATZMAYR, H. G.: Novas perspectivas em vacinas virais. História, Ciências, Saúde. Manguinhos. 2003.10 (2): 655-69.

Schroeder H. W., & Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. J. Allergy Clin Immunol. 2010. feb. 2.125 (2 suppl 2): S41-52.

Simões M. Avaliação da Acurácia e Confiabilidade do Teste Sorológico de Neutralização por Redução de Placas de Lise (Micro PRNT) na Detecção de Anticorpos para o Vírus da Febre Amarela. [Dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos; 2011.

Snow M. Mumps makes a comeback. [Internet] Nursing 2006. [acesso em: 2013 set 29] 36 (1):18-19. Disponível em: www.nursing2006.com

Thomas S. J, Nisalak A, Anderson KB, Libraty DH, Kalayanarooj S, Vaughn DW, Putnak R, Gibbons RV, Jarman R, Endy TP. Dengue plaque reduction neutralization test (PRNT) in primary and secondary dengue virus infections: How alterations in assay conditions impact performance 2009. Am J Trop Med Hyg. Nov. 81 (5): 825-33.

Tiel F.H.V., Kraaijeveld C. A., Baller J. Harmsen T., Oosterlaken T. A., Snipe H. Enzyme immunoassay of mumps vírus in cell culture with peroxidase-labelled vírus specific monoclonal antibodies and its application for determination of antibodies. J. Virol. Methods. 1988. Oct. 22 (1): 99-108.

Timiryasova T.M, Bonaparte MI, Luo P, Zedar R, Hu BT, Hildreth SW. Optimization and validation of a plaque reduction neutralization test for the detection of neutralizing antibodies to four serotypes of dengue virus used in support of dengue vaccine development. Am J Trop Med Hyg. 2013. 88 (5): 962-970.

Tischer A., Andrews N., Kafatos G., Nardone A. Berbers G. Davidkin I., Aboudy Y., Backhouse J., Barbara C., Bartha K., Bruckova B., Duks A., Griskericius A., Hesketh L., Johansen K., Jones L., Kuersteiner O., Lupulescu E., Mihneva Z., Mrazova M., De Ory F., Proscenc K., Schneider F., Tsakris A., Smelhausova M., Vranckx R., Zarvou M., Miller E. Standardization of measles, mumps and rubella assays to enable comparisons of seroprevalence data across 21 European countries and Australia 2007. *Epidemiol. Infect.* Jul.135 (5): 787-97.

Vidarsson G., Dekkers G. & Rispens. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology*. 2014 out. 520 (5):1-17.

Wahala M. P. B. Wahala & Aravinda M. de Silva. The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. *Viruses* 2011. 3 (12): 2374-2395.

Wellington K., Goa K. L. Measles, Mumps, Rubella Vaccine (Priorix™; GSK- MMR). A Review of its Use in the Prevention of Measles, Mumps and Rubella. *AIDS Drug Evaluation*. 2003. 63 (19): 2107-2126.

World Health Organization - WHO, Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire [internet]. 2007 [acesso em 2013 oct 14]; 82 (7): 49-60. Disponível em: <http://www.who.int/wer/2007/wer8207.pdf>

Sites consultados:

Centers for Diseases Control and Prevention – CDC 2009. Disponível em: www.cdc.gov/mumps/clinical/qa-disease.html#b - acesso em 4/10/2013.

Centers for Diseases Control and Prevention – CDC 2010a. Disponível em: www.cdc.gov/mumps/about/transmission.html - acesso em: 4/10/2013.

Centers for Diseases Control and Prevention – CDC 2010b. Disponível em: www.cdc.gov/mumps/about/complications.html - acesso em: 4/10/2013.

Centers for Diseases Control and Prevention – CDC 2012. Disponível em: www.cdc.gov/mumps/lab/qa-lab-test-infect.html - acesso em: 4/10/2013.

Centro de Vigilância Epidemiológica – CVE 2005. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/resp/caxu_protocolo.pdf - acesso em: 6/10/2013.

Secretaria de Vigilância em saúde- SVS 2013a. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1544 – acesso em: 01/10/2013.

Secretaria de Vigilância em saúde- SVS 2013b. Disponível em: ["http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=43270&janela=1"](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=43270&janela=1) - acesso em: 19/10/2013.

Secretaria de Vigilância em saúde - SVS 2013c. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=29489 - acesso em: 19/10/2013.

World Health Organization - WHO 2013a. Disponível em: www.who.int/entity/ith/diseases/mumps/en/ - 21k - acesso em: 10/10/2013.

World Health Organization - WHO 2013b. Disponível em:

www.who.int/immunization_monitoring/diseases/mumps_surveillance/en/index.html -

acesso em: 10/10/2013.