

Vanessa Cristina Rezende Melandri

PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE INIBIÇÃO DE
LIGAÇÃO DA TOXINA (ToBI) PARA DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA
DE VACINAS E SOROS ANTIDIFTÉRICOS E ANTITETÂNICOS

Mestrado Acadêmico
PPGVS/INCQS
FIOCRUZ
2010

PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE INIBIÇÃO DE
LIGAÇÃO DA TOXINA (ToBI) PARA DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA
DE VACINAS E SOROS ANTIDIFTÉRICOS E ANTITETÂNICOS

Vanessa Cristina Rezende Melandri

Mestrado Acadêmico
Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadoras: Isabella Fernandes Delgado e Karen Friedrich

Rio de Janeiro

2010

PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE INIBIÇÃO DE LIGAÇÃO DA TOXINA (ToBI) PARA DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DE VACINAS E SOROS ANTIDIFTÉRICOS E ANTITETÂNICOS

Vanessa Cristina Rezende Melandri

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras Instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

Prof. _____(INCQS/FIOCRUZ)
Dr. Wlamir Correa de Moura

Prof^ª. _____(UFF)
Dra. Claudia Lamarca Vitral

Prof^ª. _____(INCQS/FIOCRUZ)
Dra. Cátia Inês Costa

Orientadora _____(INCQS/FIOCRUZ)
Prof^ª. Dra. Isabella Fernandes Delgado

Orientadora _____(INCQS/FIOCRUZ)
Prof^ª. Dra. Karen Friedrich

Rio de Janeiro

2010

Melandri, Vanessa Cristina Rezende

Padronização e validação do método de inibição de ligação da toxina (ToBI) para determinação da potência de vacinas e soros antidiftéricos e antitetânicos.

Vanessa Cristina Rezende Melandri. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2010.

xvi, 92 p., il., tab.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro 2010. Orientadoras: Isabella Fernandes Delgado e Karen Friedrich.

1.ToBI 2. Métodos alternativos 3. Teste de potência 4. Controle da qualidade

Implementation and validation the toxin inhibition binding (ToBI) test to evaluate the potency of antidiphtheric and antitetanic sera and combined bacterial vaccines.

Aos meus pais, pela vida, pela
educação e pelo suporte.
Aos animais, que doaram suas
vidas ao conhecimento científico.

"Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante."

Albert Schweitzer - Nobel da Paz de 1952

AGRADECIMENTOS

As minhas orientadoras, Dra. Isabella Fernandes Delgado e Dra. Karen Friedrich, por terem acreditado. Serei eternamente grata pelo ensinamento, apoio, incentivo, paciência e amizade;

Aos meus queridos amigos de laboratório Andréa Larangeira, Cristiane Fortes, Karen Friedrich, Rodrigo Caruso e Sérgio Lourenço pela colaboração na confecção deste trabalho, pela paciência e pelos momentos de descontração;

A equipe do Departamento de Imunologia do INCQS que, de alguma forma, contribuiu para a realização deste estudo;

Ao colega Sérgio Alves da Silva, do Departamento de Química, pela ajuda na parte estatística do projeto;

A Claudia Molinaro e Jorge Batista Almeida de Biomanguinhos/FIOCRUZ por cederem gentilmente alguns reagentes;

Aos amigos do Departamento de Farmacologia e Toxicologia, Cristiane, Eloísa, João Carlos (Profeta), Octávio, Rosaura e Ronald por me iniciarem na pesquisa com métodos alternativos;

As amigas Izabela Gimenez e Liana Lucena, pelo incentivo, companheirismo e paciência. Obrigada pelos conselhos e pela amizade!

A Coordenação de Pós Graduação do INCQS pela organização do curso de Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária;

A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela colaboração financeira para a realização deste projeto.

RESUMO

Produtos biológicos, tais como soros hiperimunes e vacinas, podem ser definidos como produtos derivados ou produzidos a partir de organismos vivos. Isso implica que suas características podem variar de um lote para outro. Conseqüentemente, um minucioso controle da qualidade na liberação de lotes é requerido para garantir que esses produtos sejam seguros e eficazes. O ensaio de potência com animais é um dos ensaios preconizados para garantir a qualidade das vacinas e soros hiperimunes. Somente para realização do ensaio de potência para o produto final de vacinas e soros antidiftéricos (SAD) e antitetânicos (SAT), são utilizados no INCQS cerca de 5.000 animais por ano, desses aproximadamente 4.500 animais são utilizados na etapa de soroneutralização e o restante na etapa de imunização. Neste contexto, e baseado nos princípios dos 3Rs, o objetivo deste trabalho foi padronizar e validar o método imunoenzimático de inibição da ligação da toxina (ToBI) capaz de avaliar a potência de SAD, SAT e de vacinas bacterianas combinadas: tétano-difteria uso adulto (dT) e uso infantil (DT) e tétano-difteria-pertussis (DTP), como alternativa da etapa de soroneutralização do ensaio de controle de potência. Os resultados encontrados indicam que o método proposto apresenta linearidade, especificidade e precisão (intra e inter-ensaio) satisfatórias e que é um ensaio confiável, rápido e conveniente para avaliar a potência de componentes diftérico e tetânico presentes em vacinas e soros hiperimunes. Além disso, reduz drasticamente o número de animais usados, o tempo na liberação de laudos e os custos associados ao controle da qualidade destes produtos. O método ToBI apresenta potencial para a substituição do ensaio em animais na determinação de potência de vacinas e soros antidiftéricos e antitetânicos. Entretanto, para efeitos regulatórios, se faz necessária a realização de um estudo colaborativo, envolvendo laboratórios de diversos segmentos, para conclusão da validação da metodologia considerando os parâmetros já avaliados nessa etapa.

ABSTRACT

Biological products such as vaccines and hyperimmune sera, can be defined as products derived or produced from living organisms. This implies that characteristics may vary from one batch to another. Therefore a thorough quality control of lots is required to ensure safety and effectiveness. The potency test *in vivo* is one of the tests recommended to ensure quality of vaccines and sera. For the potency test of bacterial vaccines and sera 5.000 animals approximately are used in INCQS per year. Circa 4.500 of these animals are used on the neutralization step and the remainder on step of immunization. In this context and based on the principles of 3Rs, the aim of this study was to implement and to validate the toxin inhibition binding (ToBI) test in order to evaluate the potency of antidiphtheric and antitetanic sera and combined bacterial vaccines: diphtheria-tetanus adult (dT) and children (DT) use and diphtheria-tetanus-pertussis (DTP), as an alternative to the neutralization step for potency control. The results indicate that the proposed method shows satisfactory linearity, specificity and accuracy (intra-assay and inter-assay) and reliability. The ToBI test is a fast and convenient way to assess the potency of diphtheria and tetanus components present in vaccines and sera. In addition, it is a useful tool to reduce the number of animals used, the time for lot release and financial costs. The ToBI test can be considered suitable for the replacement of animal testing in the determination of potency of vaccines and serums for diphtheria and tetanus quality control of biopharmaceuticals. However, for regulatory purposes, a collaborative study involving laboratories from different segments is still necessary, considering the parameters already evaluated in this step.

LISTA DE ABREVIATURAS

3Rs – Três Erres

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BCG – Bacilo de Calmette-Guérin

BSA – Bovine serum albumin (albumina sérica bovina)

CDC – Center for Disease Control

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CV – Coeficiente de Variação

DE50 – Dose efetiva 50%

DP – Desvio Padrão

DO – Densidade Ótica

DTP – Vacina contra difteria, tétano e pertussis

DTPa – Vacina contra difteria, tétano e pertussis acelular

dT – Vacina adulta contra difteria e tétano

DT – Vacina infantil contra difteria e tétano

DTP-Hib – Vacina contra difteria, tétano, pertussis e haemophylus influenza B

DNV – Dia Nacional de Vacinação

ECVAM – European Centre for the Validation of Alternative Methods

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FDA – Food and Drug Administration

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HA – hemaglutinação

IgG – Imunoglobulina

IGHAT – Imunoglobulina humana antitetânica

IM – Intramuscular

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IV – Intravenosa

LNC – Laboratório Nacional de Controle
LD – Limite de Detecção
Lf – Limite de Flocculação
LQ – Limite de Quantificação
MS – Ministério da Saúde
N – Número de experimentos realizados
NIBSC – National Institute for Biological Standards and Control
NIH – National Institutes of Health
OMS – Organização Mundial de Saúde
OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde
PBS – Phosphate Buffered Saline (salina tamponada com fosfato)
PNI – Programa Nacional de Imunização
SA – Soro animal
SAD – Soro Antidiftérico
SAT – Soro Antitetânico
SC – Subcutânea
SH – Soro hiperimune
SN – Soroneutralização
SNC – Sistema Nervoso Central
SRI – Soro de Referência Internacional
SRN – Soro de Referência Nacional
SNVS – Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SUS – Sistema Único de Saúde
SVB – Setor de Vacinas Bacterianas
TAT – Toxina-antitoxina
ToBI – Toxin Binding Inhibition
TMB – tetrametilbenzidina
UI – Unidade Internacional
VIP – Vacina inativada contra poliomielite
WHO – World Health Organization

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Calendário de vacinação da criança.....	09
TABELA 2	Definições dos testes de segurança biológica.....	17
TABELA 3	Definições dos testes de eficácia.....	18
TABELA 4	Parâmetros de validação de um método analítico.....	23
TABELA 5	Número de lotes ensaiados e animais utilizados para análise de potência dos componentes diftérico e tetânico entre 2005 e 2008 no Setor de Vacinas.....	26
TABELA 6	Número de animais utilizados por ensaio.....	27
TABELA 7	Valores de L+/10/50 das toxinas diftérica e tetânica no ensaio de soroneutralização in vivo.....	44
TABELA 8	Avaliação da especificidade do ToBI para componente diftérico e tetânico.....	47
TABELA 9	Valores de absorbância (por poço) do controle negativo utilizando PBS e do controle negativo utilizando toxina heteróloga obtidos no ToBI para o componente diftérico.....	48
TABELA 10	Valores de absorbância do controle negativo utilizando PBS e do controle negativo utilizando toxina heteróloga obtidos no ToBI para o componente tetânico.....	49
TABELA 11	Avaliação da precisão intra-ensaio (CV% intra) e inter-ensaio (CV% inter) do ToBI para o componente diftérico através dos coeficientes de variação (CV%) entre as absorbâncias obtidas para cada amostra.....	51
TABELA 12	Avaliação da precisão intra-ensaio (CV% intra) e inter-ensaio (CV% inter) do ToBI para o componente tetânico através dos coeficientes de variação (CV%) entre as absorbâncias obtidas para cada amostra.....	52

TABELA 13	Avaliação da precisão intra-ensaio (CV% intra) e inter-ensaio (CV% inter) do ToBI para o componente diftérico através dos coeficientes de variação (CV%) entre as absorbâncias obtidas para cada amostra em ensaios realizados por analistas diferentes.....	53
TABELA 14	Avaliação da precisão intra-ensaio (CV% intra) e inter-ensaio (CV% inter) do ToBI para o componente tetânico através dos coeficientes de variação (CV%) das absorbâncias obtidos em ensaios realizados por analistas diferentes.....	54
TABELA 15	Análise de variância (ANOVA) do ToBI para componente diftérico de ensaios realizados por analistas diferentes.....	55
TABELA 16	Análise de variância (ANOVA) do ToBI para componente tetânico de ensaios realizados por analistas diferentes.....	56
TABELA 17	Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).....	56
TABELA 18	Comparação dos controles diluídos em PBS com os controles diluídos em soro animal não imunizado.....	62
TABELA 19	ANOVA entre ToBI utilizando primeira e segunda sangria para componente tetânico.....	63
TABELA 20	Valor de potência estimado pelo ensaio ToBI para componente diftérico	64
TABELA 21	Valor de potência estimado pelo ensaio ToBI para componente tetânico	64
TABELA 22	Comparação das concentrações dos reagentes utilizados e das características das diferentes etapas do ToBI encontrados na literatura.....	68
TABELA 23	Variação de cálculo de potência para o ensaio ToBI entre diferentes autores.....	73
TABELA 24	Estudos que utilizaram o ToBI para avaliação de soroconversão ou da potência de imunobiológicos de uso humano.....	81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Resposta imune ao toxóide tetânico.....	16
FIGURA 2	Número de lotes de produtos analisados pelo Setor de Vacinas Bacterianas entre 2005 e 2008.....	25
FIGURA 3	Esquema de distribuição dos soros na placa.....	35
FIGURA 4	Esquema resumido do procedimento do ensaio ToBI.....	37
FIGURA 5	Distribuição dos diferentes soros na placa com 2 condições de toxina: somente a toxina específica (diftérica ou tetânica) e as duas toxinas misturadas.....	39
FIGURA 6	Distribuição dos controles positivos das duas toxinas e do controle negativo em dois tipos de diluentes (PBS e soro animal não imunizado).....	42
FIGURA 7	Titulação da toxina diftérica e do anticorpo conjugado à peroxidase utilizando soro de captura antidiftérico (20 µg/mL).....	45
FIGURA 8	Titulação da toxina tetânica e do anticorpo conjugado à peroxidase utilizando soro de captura antitetânico (20 µg/mL).....	46
FIGURA 9	Coefficiente de correlação do SRI para o componente diftérico.....	50
FIGURA 10	Coefficiente de correlação do SRI para o componente tetânico.....	50
FIGURA 11	Limites de confiança dos valores de absorbância obtidos pelo controle negativo utilizado no ToBI para determinação de potência do componente diftérico.....	58
FIGURA 12	Limites de confiança dos valores de absorbância obtidos pelo controle positivo utilizado no ToBI para determinação de potência do componente diftérico.....	59

FIGURA 13	Limites de confiança dos valores de absorvância obtidos pelo controle negativo utilizado no ToBI para determinação de potência do componente tetânico.....	60
FIGURA 14	Limites de confiança dos valores de absorvância obtidos pelo controle positivo utilizado no ToBI para determinação de potência do componente tetânico.....	61
FIGURA 15	Correlação dos resultados de potência obtidos no ensaio <i>in vivo</i> (laboratório produtor) e pelo ToBI <i>in vitro</i> do componente diftérico	65
FIGURA 16	Correlação dos resultados de potência obtidos no ensaio <i>in vivo</i> (laboratório produtor) e pelo ToBI <i>in vitro</i> do componente tetânico	65

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Acontecimentos marcantes no Brasil de 1969 a 2004 relacionados à vacinação.....	06
QUADRO 2	Métodos alternativos <i>in vitro</i> utilizados e/ou preconizados para determinação da potência de componentes diftéricos e tetânicos.....	21
QUADRO 3	Vantagens e desvantagens do teste ToBI (<i>in vitro</i>) e do teste de soroneutralização (<i>in vivo</i>).....	78

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA FIGURAS	xiv
LISTA DE QUADROS.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1 – Breve história da vacina	3
1.1.1 – Início da vacinação	3
1.1.2 – Pasteur e vacinas atenuadas	4
1.2 – Programa Nacional de Imunizações (PNI) no Brasil	5
1.3 – Difteria.....	8
1.4 –Tétano	13
1.5 – Controle da qualidade de vacinas	17
1.6 – Ensaio de potência <i>in vivo</i> para os componentes diftérico e tetânico	19
1.7 – Desenvolvimento de métodos alternativos para avaliação de potência dos componentes diftérico e tetânico	20
1.8 – Validação de métodos alternativos	22
1.9 – Justificativa.....	24
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 – Objetivo Geral	28
2.2 - Objetivos Específicos.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 – Amostras de soros, toxinas e reagentes	29
3.1.1 - Soros de referência nacional (SRN) e internacional (SRI)	29
3.1.2 - Soros equinos hiperimunes (Soro hiperimune).....	30
3.1.3 - Soro de animais imunizados com as vacinas dT e DTP Hib.....	30
3.1.4 – Toxina tetânica e toxina diftérica	32
3.2 – Teste de inibição de ligação da toxina - ToBI (<i>Toxin Binding Inhibition</i>).....	33
3.2.1 - Titulação cruzada dos reagentes (diftérico e tetânico)	33
3.2.2 - Método ToBI.....	34
3.3 – Limites de Confiança para os Controles Positivo e Negativo	38
3.4 – Parâmetros de Validação	39
3.4.1 – Especificidade.....	39
3.4.2 – Linearidade	40
3.4.3 – Precisão.....	40
3.4.4 - Limite de Detecção.....	41
3.4.5 - Limite de Quantificação	41
3.5 – Avaliação da possível interferência de componentes do soro animais.....	42
3.6 – Única sangria para potência diftérica e tetânica	43
3.7 – Correlação entre os resultados de potência do ensaio ToBI com o produtor	43
4. RESULTADOS	44
4.1- Determinação da L+/10/50 <i>in vivo</i>	44

4.1.1- Toxina Diftérica	44
4.1.2- Toxina Tetânica.....	44
4.2 - Titulação dos reagentes para ToBI.....	45
4.2.1 - Componente diftérico.....	45
4.2.2 - Componente tetânico.....	46
4.3 – Avaliação dos parâmetros de validação do ToBI	47
4.3.1 – Especificidade.....	47
4.3.2 – Linearidade	49
5.3.3 – Precisão (intra-ensaio e inter-ensaio)	51
5.3.4 – Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)	56
5.4 – Determinação dos Limites de Confiança.....	57
5.5 – Avaliação da possível interferência de componentes do soro de animais	61
5.6 – Comparação dos resultados do soro obtido após 4 e 6 semanas de imunização no ToBI para o componente tetânico.....	62
5.7 – Correlação entre os resultados <i>in vivo</i> do laboratório produtor e do ToBI (<i>in vitro</i>)	63
5. DISCUSSÃO	66
5.1 Validação do ToBI.....	70
5.2 Relevância do ToBI para o controle de potência de soros e vacinas.....	76
6. CONCLUSÕES	84
7. PERSPECTIVAS	85
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Breve história da vacina

1.1.1 – Início da vacinação

A história da vacinação é um dos mais belos e bem sucedidos capítulos da evolução da medicina. A descoberta e aperfeiçoamento das vacinas foram impulsionados por muitos fatores, sendo os de natureza psicossocial, como o terror das epidemias, e econômica pelos prejuízos na agricultura e na veterinária, os mais importantes (MARTINS et al., 2008).

O termo vacinação foi citado pela primeira vez como referência à *vaccinia*, o vírus da varíola bovina. O adjetivo latino *vaccina* (de vaca) foi substantivado e adaptado a diversos idiomas: inglês, *vaccine*; francês, *vaccin*; alemão, *vakzine*; espanhol, *vacuna*; italiano, *vaccino*; português, *vacina*. Por analogia, passou a designar todo inóculo dotado de ação antigênica, independente de sua origem (TEIXEIRA & ALMEIDA, 2003).

Na luta contra a varíola, doença que constituiu verdadeiro flagelo humano até o século XVIII, os povos orientais utilizavam há mais de mil anos a chamada "variolização", que consistia na inoculação de material retirado das pústulas de um enfermo, na pele de um indivíduo sadio. Este adquiria a forma mais branda da enfermidade do que a adquirida através do contágio natural. Apesar de sua relativa benignidade, a doença se manifestava com todo o seu cortejo sintomático, deixando, por vezes, cicatrizes no rosto e no corpo das pessoas inoculadas (FEIJÓ & SÁFADI, 2006).

Em Berkeley, na Inglaterra, o médico Edward Jenner revolucionou o método de prevenção da varíola. Nessa cidade, o gado era acometido com frequência de uma doença semelhante à varíola humana, conhecida por "cowpox" (varíola bovina). As vacas acometidas por esta doença apresentavam vesículas e pústulas no ubere e as pessoas que as ordenhavam adquiriam a doença, manifestando lesões semelhantes nas mãos, que desapareciam espontaneamente. A população rural observava frequentemente que as pessoas que adquiriam a varíola bovina ficavam protegidas da varíola humana, conhecida em inglês por "smallpox" (TEIXEIRA & ALMEIDA, 2003). Durante 20 anos, Jenner

coleccionou pacientemente observações que demonstravam que os indivíduos previamente contaminados pela doença bovina ficavam refratários à varíola. Em maio de 1796 realizou a sua experiência crucial; ele inoculou a linfa retirada de uma vesícula da mão de uma mulher, que havia adquirido a varíola bovina ordenhando vacas doentes, na pele do braço de um menino. A criança desenvolveu a conhecida reação eritêmato-pustulosa no local da escarificação e escassos sintomas gerais. Decorridas 6 semanas, Jenner inoculou o pus da varíola humana na criança, e esta não desenvolveu a doença. Estava descoberta a vacina antivariólica (LEVI & KALLÁS, 2002; MARTINS et al., 2008).

Apesar de uma resistência inicial da Royal Society em Londres, a vacinação antivariólica difundiu-se por todo o mundo, ganhando credibilidade, principalmente após a decisão de Napoleão Bonaparte de ordenar a vacinação do exército francês, tornando-o imune à varíola. Celebrando o sucesso de Jenner, em 1980, menos de 200 anos após a descoberta da vacina, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarava que a varíola havia sido erradicada mundialmente (FERNANDES, 1999).

No Brasil, a vacinação antivariólica tornou-se obrigatória ainda no século XVIII, porém era praticada de maneira irregular e ao mesmo tempo combatida e rejeitada pela população. Os surtos epidêmicos continuaram ocorrendo no século XIX e a vacinação só se tornou efetiva a partir do século XX, após a campanha iniciada no Rio de Janeiro por Oswaldo Cruz (TEIXEIRA & ALMEIDA, 2003).

1.1.2 – Pasteur e vacinas atenuadas

Louis Pasteur, além dos famosos estudos com fermentação, também dirigiu sua atenção para o estudo das doenças animais com importância econômica (FEIJÓ & SÁFADI, 2006).

Pasteur e seus colaboradores dedicados a resolver o problema da cólera das galinhas, cultivaram agentes da cólera (*Pasteurella multocida*). Pasteur verificou que a inoculação de uma cultura envelhecida não era capaz de matar os animais de experimentação, e ainda poderia proteger contra a inoculação de culturas virulentas. Assim, foi descoberta a atenuação de microrganismos em laboratório, importante ferramenta para o desenvolvimento de vacinas bacterianas e virais (FERNANDES, 1999).

Em 1890, von Behring e Kitasato deram nova compreensão para os mecanismos de imunidade através da demonstração de que o soro de animais previamente imunizados à difteria, poderia transferir o estado imune a animais não-imunizados. Em seguida, vários pesquisadores demonstraram que o soro imune poderia neutralizar e precipitar toxinas ou lisar e aglutinar bactérias. O agente ativo presumível dessas ações foi denominado antitoxina (MARTINS et al., 2008).

Os séculos XVIII e XIX tiveram dois grandes marcos na história da vacinação: Jenner com suas observações sobre a indução de proteção contra a varíola e Pasteur com as vacinas atenuadas. Desde então o incremento do conhecimento nas áreas de imunologia e biologia molecular propiciaram o crescimento consolidado da diversidade de vacinas disponíveis à população humana. Dessa maneira, as vacinas tornaram-se ferramentas indispensáveis ao controle de muitas doenças infecto-contagiosas (ROCHA & PIMENTEL, 2008).

A vacinação rotineira só passou a ser adotada durante a Segunda Guerra Mundial (1939-1945). A partir de 1943, a vacinação com toxóide tetânico e toxóide diftérico passou a ser compulsória na França e posteriormente teve sua utilização universal. Em 1948, os toxóides tetânico e diftérico passaram a ser preparado em combinação com a vacina antipertussis (DTP), que foi licenciada para uso nos EUA no ano seguinte (CDC, 2000; ROPER et al., 2007).

1.2 – Programa Nacional de Imunizações (PNI) no Brasil

O sucesso da Campanha de Erradicação da Varíola fortaleceu dentro do Ministério da Saúde (MS), uma corrente que defendia maiores investimentos no controle de doenças infecciosas preveníveis pela imunização. Algumas iniciativas importantes ocorridas no período, que se estende de 1973 a 1980, permitem perceber a construção de uma base técnica, política e institucional que apenas nas décadas seguintes iria consolidar-se como importante ferramenta do Estado no controle efetivo de algumas doenças no país (TEMPORÃO, 2003). Os programas de imunização foram se consolidando gradualmente no Brasil, especialmente entre as décadas de 1970 a 1990 (Quadro 1).

Quadro 1: Acontecimentos marcantes no Brasil de 1969 a 2004 relacionados à vacinação

ANO	EVENTO
1969	Criação do sistema de notificação de doenças transmissíveis, com prioridade para aquelas evitáveis por vacina através de um Boletim Epidemiológico
1973	Criação do Programa Nacional de Imunização (PNI). Erradicação da varíola
1976	Criação do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-manguinhos/Fiocruz)
1977	Definição das vacinas obrigatórias e aprovada a Caderneta de Vacinações
1979	Importação do concentrado viral para produção da vacina de sarampo (Fiocruz)
1980	Extinção da obrigatoriedade de vacinação contra varíola e elaboração do Plano de ação contra a poliomielite
1981	Inauguração do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Fiocruz)
1983	Recomendação de estratégias de dias nacionais de vacinação pela Opas e Unicef.
1986	Criação do Zé Gotinha, marca-símbolo da campanha contra poliomielite.
1989	Último caso de poliomielite no Brasil.
1991	Intensificação da vacinação de recém-nascidos com BCG. Introdução da vacina contra febre amarela em área endêmica.
1992	Criação Plano Nacional de Eliminação do Sarampo e inclusão das vacinas da tríplice viral e hepatite B no calendário infantil.
1993	Criação dos Centros de Referência de Imunobiológicos Especiais – os CRIEs
1994	Vacinação contra febre amarela passou para a responsabilidade do PNI
1997	Ressurgimento de sarampo no país. Campanha de Vacinação Nacional realizada com 95,82% de cobertura vacinal no país
1998	Implantação da vacina contra <i>Haemophilus influenzae</i> do tipo b (Hib). Informatização do Sistema de Vigilância de Eventos Adversos Pós-vacinação
2000	Criação da Comissão de Peritos do MS para casos de evento adverso grave após vacinação contra febre amarela
2001	Iniciação da estratégia de vacinação para grupo de mulheres que ainda não haviam recebido as vacinas contra rubéola e sarampo
2003	Realização da quinta Campanha Nacional de Vacinação do Idoso com a cobertura de 82,1% e marcante queda dos casos de óbitos por Hib
2004	Mais dois calendários foram criados no país, um destinado aos adolescentes e outro à população adulta e idosa, que se agregaram ao calendário da criança

Referências: TEMPORÃO, 2003; TEMPORÃO et al., 2005; MARTINS et al., 2008 e MS, 2003

Em 1973, foi criado o Programa Nacional de Imunizações e até hoje ele considerado como referência para a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Desde as primeiras vacinações, o Brasil acumulou quase 200 anos de imunizações, sendo que somente a partir da criação do PNI, desenvolveu ações planejadas e sistematizadas. As competências do Programa estabelecidas no decreto nº 78.231 de 12 de agosto de 1976 foram (BRASIL, 1976):

- implantar e implementar as ações relacionadas com as vacinações de caráter obrigatório;
- estabelecer critérios e prestar apoio técnico a elaboração, implantação, implementação dos programas de vacinação a cargo das secretarias de saúde das unidades federadas;
- estabelecer normas básicas para a execução das vacinações;
- supervisionar, controlar e avaliar a execução das vacinações no território nacional, principalmente o desempenho dos órgãos das secretarias de saúde, encarregados dos programas de vacinação;
- centralizar, analisar e divulgar as informações referentes ao PNI.

Diversas estratégias erradicaram a febre amarela urbana em 1942, a varíola em 1973 e a poliomielite em 1989, controlaram o sarampo, o tétano neonatal, as formas graves da tuberculose, a difteria, o tétano acidental e a coqueluche. Mais recentemente, implementaram medidas para o controle das infecções pelo *Haemophilus influenzae* tipo b, da rubéola e da síndrome da rubéola congênita, da hepatite B, da influenza e suas complicações nos idosos, também das infecções pneumocócicas (MS, 2003).

O objetivo prioritário do PNI era promover o controle da poliomielite, do sarampo, da tuberculose, da difteria, do tétano, da coqueluche e manter erradicada a varíola. Hoje, o PNI tem objetivo mais abrangente de contribuir para a manutenção da situação de erradicação da febre amarela urbana, poliomielite e sarampo; zerar os casos de tétano neonatal; manter o controle da tuberculose em suas formas graves, difteria, tétano acidental, coqueluche, febre amarela silvestre e raiva humana; alcançar e manter o controle da influenza, infecções pneumocócicas e suas complicações, infecções por *Haemophilus influenzae* tipo b, rubéola e síndrome rubéola congênita, hepatite B e caxumba na

população idosa; contribuir para o controle de doenças imunopreviníveis e suas complicações na parcela populacional portadora de condições clínicas específicas e para o controle de surtos ocasionais de doenças imunopreviníveis e de acidentes por animais peçonhentos (MS, 2003 e TEMPORÃO et al., 2005).

Torna-se cada vez mais evidente que a vacina é o único meio para interromper a cadeia de transmissão de algumas doenças imunopreviníveis. Entretanto, o cumprimento do calendário de vacinação (Tabela 1) e dos critérios de qualidade descritos nas normas oficiais são imprescindíveis para o sucesso da vacinação e controle das doenças infecto-contagiosas (MS, 2003). Com o aumento do quadro vacinal, a combinação de vacinas para diferentes doenças tornou-se uma estratégia importante para diminuir os custos e também alcançar níveis desejados de cobertura.

1.3 – Difteria

A doença foi descrita no século V a.C. por Hipócrates e os primeiros relatos epidemiológicos foram descritos por Arateus, que a denominava de “úlceras sobre as amígdalas”. No século XIX, a persistência da epidemia diftérica causou altos índices de morbidade e mortalidade entre crianças na Europa e na América do Norte, excedendo 50 por 100,000 anualmente (CDC, 2000; VITEK, 2006). A bactéria foi observada primeiramente em membrana diftérica por Klebs em 1883 e cultivada por Löffler em 1884. A orofaringe é o local onde a bactéria se instala e permanece, multiplicando-se e produzindo exotoxina que inibe a síntese de proteínas celulares e é responsável pela distribuição local do tecido e formação da membrana. A toxina produzida no sítio da membrana é absorvida pela corrente sanguínea, indo para o miocárdio e nervos periféricos. A transmissão do bacilo é direta, por intermédio de secreções do paciente ou do portador assintomático, exigindo contato íntimo respiratório ou físico (CDC, 2000; MIYAJI et al., 2001; MENDONZA et al., 2009).

A difteria é uma doença contagiosa, exclusiva de seres humanos, que acomete predominantemente crianças nas fases pré-escolar e escolar. Trata-se de toxinfecção causada pela exotoxina produzida pelo *Corynebacterium diphtheriae* que é um bacilo aeróbico Gram-positivo, pleomórfico, imóvel e não formador de esporos (BRASIL, 2008; MOKROUSOV, 2009).

Tabela 1: Calendário de vacinação da criança

IDADE	VACINAS	DOSE	DOENÇAS
Ao Nascer	BCG - ID Vacina contra hepatite b (1)	dose única 1ª dose	Formas grave de tuberculose Hepatite B
1 mês	Vacina contra hepatite b	2ª dose	Hepatite B
2 meses	Vacina Tetravalente (DTP+Hib) (2)	1ª dose	Difteria,tétano,coqueluche, menengite e outras infecções causadas pelo Haemophilus influenzae tipo b.
	VOP (vacina oral contra pólio) VORH (vacina oral de rotavírus humano) (3)	1ª dose 1ª dose	Poliomelite (paralisia infantil) Diarréia por Rotavírus
4 meses	Vacina Tetravalente (DTP+Hib)	2ª dose	Difteria,tétano,coqueluche, menengite e outras infecções causadas pelo Haemophilus influenzae tipo b.
	VOP (vacina oral contra pólio) VORH (vacina oral de rotavírus humano) (4)	2ª dose 2ª dose	Poliomelite (paralisia infantil) Diarréia por Rotavírus
6 meses	Vacina Tetravalente (DTP+Hib)	3ªdose	Difteria,tétano,coqueluche, menengite e outras infecções causadas pelo Haemophilus influenzae tipo b.
	VOP (vacina oral contra pólio) Vacina contra hepatite b	3ªdose 3ªdose	Poliomelite (paralisia infantil) Hepatite B
9 meses	Vacina contra febre-amarela (5)	dose inicial	Febre amarela
12 meses	SRC (tríplice viral)	dose única	Sarampo, rubéola e caxumba
15 meses	VOP (vacina oral contra pólio) DTP (tríplice bacteriana)	reforço 1º reforço	Poliomelite (paralisia infantil) Difteria, tétano e coqueluche
4 - 6 anos	DTP (tríplice bacteriana) SRC (tríplice viral)	2º reforço reforço	Difteria, tétano e coqueluche Sarampo, rubéola e caxumba
10 anos	Vacina contra febre-amarela	reforço	Febre amarela

(1) A primeira dose da vacina contra a hepatite B deve ser administrada na maternidade, nas primeiras 12 horas de vida do recém-nascido. O esquema básico se constitui de 03 (três) doses, com intervalos de 30 dias da primeira para a segunda dose e 180 dias da primeira para a terceira dose.

(2) O esquema de vacinação atual é feito aos 2, 4 e 6 meses de idade com a vacina Tetravalente e dois reforços com a Tríplice Bacteriana (DTP). O primeiro reforço aos 15 meses e o segundo entre 4 e 6 anos.

(3) É possível administrar a primeira dose da Vacina Oral de Rotavírus Humano a partir de 1 mês e 15 dias a 3 meses e 7 dias de idade (6 a 14 semanas de vida).

(4) É possível administrar a segunda dose da Vacina Oral de Rotavírus Humano a partir de 3 meses e 7 dias a 5 meses e 15 dias de idade (14 a 24 semanas de vida). O intervalo mínimo preconizado entre a primeira e a segunda dose é de 4 semanas.

(5) A vacina contra febre amarela está indicada para crianças a partir dos 09 meses de idade, que residam ou que irão viajar para área endêmica (estados: AP, TO, MA MT, MS, RO, AC, RR, AM, PA, GO e DF), área de transição (alguns municípios dos estados: PI, BA, MG, SP, PR, SC e RS) e área de risco potencial (alguns municípios dos estados BA, ES e MG). Se viajar para áreas de risco, vacinar contra Febre Amarela 10 (dez) dias antes da viagem.

Fonte: Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Imunizações. 2009

Os primeiros sintomas incluem indisposição, dor de garganta, anorexia e febre. O paciente pode se recuperar ou desenvolver prostrações, palidez, pressão alta, letargia, coma, podendo morrer entre 6 e 10 dias no caso de alta absorção de toxina (CDC, 2000; BRASIL, 2008).

As maiores complicações da difteria, incluindo a morte, são atribuídas aos efeitos da toxina. A toxina afeta órgãos e tecidos distantes do local da invasão, as mais frequentes complicações são a miocardite e a neurite. O ritmo cardíaco anormal pode ocorrer no início do curso da doença ou após algumas semanas, levando a falência cardíaca e morte. Quando o paciente desenvolve neurite, que afeta mais frequentemente os nervos motores, pode causar paralisia do palato mole em torno da terceira semana e paralisia dos músculos dos olhos, membros e diafragma depois da quinta semana. A paralisia do diafragma pode resultar em pneumonia e falência respiratória. O índice de mortalidade é de 5-10%, sendo que a predominância desses casos em pessoas com menos de 5 anos e com mais de 40 anos de idade (CDC, 2000).

Behring e Kitasato usaram soro antidiftérico como terapêutica e em seguida, Theobald Smith desenvolveu a primeira vacinação com o complexo toxina e antitoxina (TAT) (PIMENTEL & ROCHA, 2008). O tratamento com antitoxina diftérica em 1890 levou a um declínio no número de óbitos na Europa e na América do Norte. Até hoje, o tratamento baseia-se fundamentalmente, na eliminação do agente etiológico e na neutralização das toxinas circulantes. A neutralização das toxinas circulantes é realizada através da administração do soro antidiftérico (SAD), um soro heterólogo de origem eqüina, que pode ser administrado por via intramuscular e por via intravenosa. No entanto, a administração de antitoxina diftérica, não é indicada como profilaxia, somente para o tratamento da doença. (CDC, 2000).

Em 1913, foi demonstrado que injeções com mistura balanceada de toxina e antitoxina proporcionava uma eficaz imunização. O uso da preparação de toxina-antitoxina (TAT) foi rapidamente adotada em algumas cidades dos Estados Unidos e Europa. Contudo, ocasionalmente essa preparação produzia sérios efeitos adversos devido à inadequada neutralização da toxina em alguns lotes. Em 1923, Ramon demonstrou que pequenas quantidades de formaldeído causavam uma diminuição da toxicidade da toxina

diftérica enquanto mantinha sua imunogenicidade, dessa maneira produziu-se o toxóide diftérico como componente vacinal. O toxóide diftérico é produzido pelo crescimento toxigênico da *C. diphtheriae*, sendo o filtrado incubado com formaldeído para converter toxina em toxóide. Para a formulação da vacina é adsorvido com um sal de alumínio e preservado com timerosal (CDC, 2000; VITEK, 2006).

A proteção induzida pelo toxóide diftérico é conferida pela produção de anticorpos da classe IgG (antitoxinas), que neutralizam a toxina produzida pelo *C. diphtheriae*. Não se conhece, rigorosamente, o tempo de duração da imunidade conferida tanto pela vacinação com o toxóide quanto pela doença. Sabe-se que é muito rara a ocorrência de um segundo episódio, entretanto, menos de 50% dos convalescentes de difteria apresentam níveis séricos protetores de anticorpos antitóxicos, motivo pelo qual é indicada a vacinação também desses indivíduos (PATEL & DAVIDSON, 2007; BRASIL, 2008).

No Brasil, a difteria teve uma significativa redução devido às campanhas de vacinação. No período de 2000 a 2007, verificou-se tendência de declínio das taxas de incidência da difteria, com redução de 91,3% no número absoluto dos casos confirmados. Em 2007, verificou-se a redução de 55% do número de casos de difteria em relação ao ano anterior (DATASUS, 2009).

A imunização universal, com o toxóide diftérico, constitui a maneira mais adequada de prevenção e controle da doença. Apesar da vacina não proteger contra a infecção, a manutenção de título protetor elevado de antitoxina na população dificulta a proliferação de cepas toxigênicas que, por consequência, não podem manter-se em níveis altos de circulação. Portanto, havendo uma falha no esquema de vacinação, o número de pessoas imunes diminui e a bactéria volta a proliferar.

A vacina contra difteria encontra-se basicamente combinada sob 4 formas: DTP, DT, dT e DTPa. A DTP está inserida no Programa Ampliado de Imunizações da OMS e faz parte do esquema básico de proteção para crianças abaixo de sete anos de idade (CDC, 2000; PIMENTEL & ROCHA, 2008). Seu uso rotineiro foi introduzido nos Estados Unidos em 1940, sendo utilizado no mundo inteiro. No Brasil, a vacina DTP foi introduzida na década de 50 em programas isolados ou em programas de âmbito estadual e foi incluída no Programa Nacional de Imunizações (PNI) em 1973. A vacina tríplice bacteriana começou a ser produzida no Brasil pelo Instituto Butantan em 1967. A vacina DTP, usada pelo

Ministério da Saúde, tem como componentes básicos os toxóides diftérico (> 10 Lf ou 2 UI) e tetânico e células inteiras de *Bordetella pertussis* em suspensão inativadas. A DTP induz proteção de 50% a 95% contra difteria. A imunidade permanece por até 10 anos, no entanto, a imunidade tende a diminuir nos primeiros cinco anos após o esquema básico. Por esse motivo, é necessário aplicar uma dose de reforço após esse período (MENDOZA et al., 2009).

A vacina DT (dupla infantil) possui a mesma concentração de toxóide diftérico e tetânico que a DTP e é indicada para crianças que tenham contra-indicações a vacina pertussis. A vacina dT (dupla adulto) diferencia-se da DT por conter menor concentração do toxóide diftérico ($dT \leq 2$ Lf ou 0,5 UI). Essa vacina é indicada para crianças a partir de 7 anos e adultos devido a hiper-reatividade de indivíduos já sensibilizadas ao toxóide diftérico (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2004; MENDOZA et al., 2009).

A tríplice acelular (DTPa ou DTP acelular) difere da DTP (DTP celular ou DTP de célula inteira) por não conter a bactéria inteira, somente componentes antigênicos da *B. pertussis*, geralmente com três ou cinco componentes altamente purificados e adsorvidos em fosfato de alumínio. Não contém timerosal e o conservante utilizado é o 2-fonoxietanol. Essa vacina foi inserida no calendário de vacinal dos Estados Unidos a partir de 2002, sendo altamente imunogênica e apresentando menos reações adversas, quando comparada com a DTP clássica. A DTP acelular vem substituindo, em alguns países, a DTP celular, porém, como seu custo ainda é bastante elevado, não foi totalmente substituída na maioria dos países (CDC, 2000; ROCHA & PIMENTEL, 2008; BAE et al., 2009).

1.4 –Tétano

O tétano é reconhecido desde a remota antiguidade, havendo descrições do seu quadro clínico em papiros egípcios (1.600 a.C.) e nos relatos de Hipócrates (640 a.C.). Hipócrates identificou as duas formas evolutivas da doença, a localizada e a generalizada (CDC, 2000; ROCHA & PIMENTEL, 2008).

Os primeiros estudos científicos mais elaborados sobre tétano começaram no século XIX. Em 1884, Carle e Rattone induziram sintomas de tétano em coelhos após a inoculação de material da pústula de um caso fatal de tétano humano. No mesmo ano Nicolaier produziu o mesmo resultado pela inoculação de amostras de solo em animais (ROCHA & PIMENTEL, 2008). Cinco anos mais tarde, Kitasato fez cultura do agente em laboratório e observou que o tétano resulta da ação sistêmica da toxina tetânica. Em seguida, com o auxílio de seus colaboradores iniciou experimentos com antitoxina, produzida após a injeção do agente etiológico em camundongos, que resultou em 1897 no desenvolvimento de um soro para uso humano (CDC, 2000; RHEE et al., 2005).

O tétano é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada pelo bacilo anaeróbio *Clostridium tetani* comumente encontrado na natureza sob a forma de esporo. Os sintomas clínicos são causados pela ação de poderosa exotoxina (tetanospasmina), liberada pelo bacilo no local da porta de entrada da infecção. A doença pode ser localizada ou generalizada e caracteriza-se por contraturas e espasmos dos músculos esqueléticos (CDC, 2000; RHEE et al., 2005; ROPER et al., 2007; BRASIL, 2008; MENDOZA et al., 2009).

O agente etiológico é o *Clostridium tetani*, bacilo Gram-positivo e estritamente anaeróbio. Na natureza, em condições de aerobiose, o *Clostridium tetani* apresenta-se na forma de esporo, medindo de 4 a 10 micra de comprimento, sendo capaz de resistir durante vários anos às condições ambientais. Os esporos podem ser encontrados em espinhos e pequenos ramos de plantas, pregos, latas enferrujadas e sujas de terra ou areia contaminada, instrumentos de lavoura e agulhas de injeção. A bactéria faz parte da microflora intestinal de alguns animais, sendo freqüentemente encontrados em áreas contaminadas por fezes desses animais, podendo ocorrer também em humanos (CDC, 2000; BHATIA et al., 2002; RHEE et al., 2005; ROGERS & FRYKBERG, 2006; BRASIL, 2008).

O início do processo infeccioso ocorre com a introdução dos esporos nos tecidos da área da lesão. Os esporos, em condições de anaerobiose, se transformam na forma vegetativa estimulados por vários fatores que diminuem o potencial oxirredutor no local, tais como: presença de corpos estranhos (terra, fragmentos metálicos ou de madeira), queimaduras, tecidos necrosados e pus (CDC, 2000; ROPER et al., 2007; MENDOZA et al., 2009).

A principal toxina liberada é a tetanospasmina, uma neurotoxina, responsável pela sintomatologia neuromuscular da doença. Ela é absorvida rapidamente e migra em horas ou poucos dias do foco da infecção até o Sistema Nervoso Central (SNC), através das fibras dos nervos motores. Ao atingir o SNC, a toxina age na sinapse entre os neurônios motores inferiores e os interneurônios inibidores de Rushaw, reduzindo ou bloqueando a ação inibidora entre eles (ROCHA & PIMENTEL, 2008).

A distribuição epidemiológica permite definir que o tétano é cosmopolita e considerado uma das doenças infecciosas de mais alta letalidade. Sua incidência está associada às condições socioeconômicas e a cobertura vacinal da população, sendo um grave problema de saúde pública para muitos países subdesenvolvidos da América Latina, África, Ásia e Oceania (ROPER et al., 2007; BRASIL, 2008).

No Brasil, o tétano ainda pode ser considerado um sério problema de saúde pública, devido ao número significativo de casos de tétano acidental e a ocorrência de tétano neonatal. No período de 2000 a 2007, verificou-se a tendência de declínio das taxas de incidência do tétano acidental, com redução de 35% no número absoluto dos casos confirmados. Em 2006, ocorreram 10 casos de tétano neonatal, com maior incidência nas regiões Norte (40%) e Nordeste (50%). Em 2007, verificou-se a redução de 50% do número de casos de tétano neonatal em relação ao ano anterior (DATASUS, 2009).

O tratamento clássico do tétano possui diferentes objetivos: erradicar o bacilo do foco de infecção, realizar o tratamento sintomático do paciente e neutralizar a toxina tetânica. Para erradicar o bacilo do foco de infecção é realizado o tratamento com antibióticos e o debridamento do local, com exceção do coto umbilical. Recomenda-se o uso prévio de soro antitetânico (SAT) ou imunoglobulina humana antitetânica sistêmica (IGHAT), para neutralizar as toxinas que ainda não se fixaram ao SNC (BHATIA et al.,

2002; ROCHA & PIMENTEL, 2008). O SAT é utilizado na dose de 10.000 a 20.000 UI, por via intramuscular ou intravenosa em qualquer idade. A IGHAT é utilizada na dose de 1.000 UI a 3.000 UI, por via intramuscular (CDC, 2000; ROGERS & FRYKBERG, 2006; ROCHA & PIMENTEL, 2008; BRASIL, 2008).

A vacinação constitui-se no meio mais eficaz, seguro e econômico de prevenção do tétano. A vacina antitetânica foi descoberta no início da década de 1920 e tem como antígeno o toxóide tetânico, obtido a partir da toxina tetânica inativada pelo formaldeído. O toxóide tetânico induz a produção de anticorpos neutralizantes da classe IgG (antitoxina), sendo altamente imunogênico, seguro e promovendo quase 100% de proteção após um esquema de imunização. O nível mínimo de anticorpos séricos considerado protetor é de 0,01 UI/ml. A imunidade contra o tétano pode ser avaliada e quantificada por testes de neutralização, imunoenzimático ou hemaglutinação passiva (CDC, 2000; MENDOZA et al., 2009; BRASIL, 2008). No entanto, a medida padrão da resposta imune ao toxóide tetânico é o teste de soroneutralização da toxina (CDC, 2000; BHATIA et al., 2002; ROGERS & FRYKBERG, 2006; BRASIL, 2008).

As apresentações da vacina contra o tétano (TT, DT, dT, DTP e DTPa) utilizadas atualmente no Brasil, geralmente, contém ≥ 10 Lf (limite de floculação¹) de toxóide tetânico purificado ou ≥ 2 UI de potência (Unidade Internacional), tendo sais de alumínio como adjuvante (hidróxido ou fosfato). Dependendo da apresentação, tem como preservante o timerosal ou o 2-fenoxietanol. A diferença entre as várias apresentações da vacina contra tétano dependerá dos demais componentes combinados ao toxóide tetânico (ROCHA & PIMENTEL, 2008; BRASIL, 2008).

¹ Limite de floculação (Lf): unidade de concentração da toxina ou toxóide determinada por técnica de Ramon.

Roper e colaboradores (ROPER et al., 2007) demonstraram recentemente que ao aplicar doses sucessivas de DTP, o período de proteção aumenta gradualmente e que a partir da 4ª dose, os níveis protetores de anticorpos permanecem pelo menos por 10 anos, para a maioria das pessoas vacinadas (Figura 1).

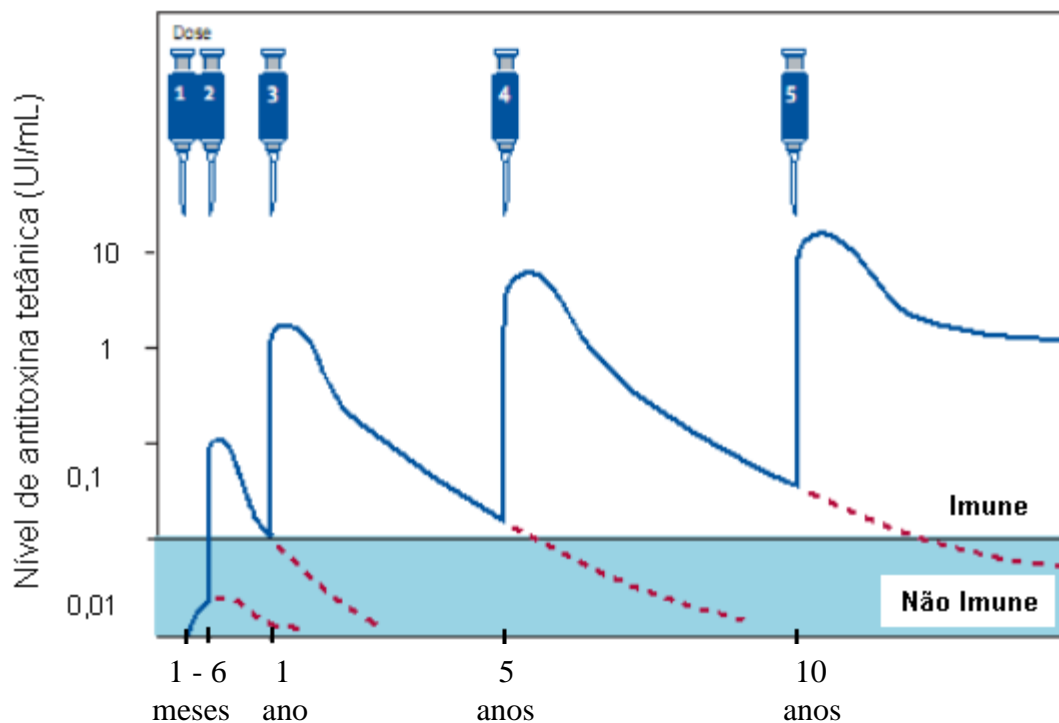


Figura 1: Resposta imune ao toxóide tetânico. Adaptado de ROPER et al., 2007

1.5 – Controle da qualidade de vacinas

O controle da qualidade de vacinas é uma ação da Vigilância Sanitária de extrema importância, uma vez que esse tipo de produto possui a peculiaridade de ser administrado em pessoas sadias (MIRANDA & HENRIQUES, 2005). Entende-se por Vigilância Sanitária o conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde (BRASIL, 1990). Dessa maneira, as autoridades sanitárias devem não só garantir a disponibilidade, mas também assegurar a qualidade e eficácia dos imunobiológicos utilizados no país, de acordo com as normas oficiais. Ações de Vigilância Sanitária que permitam estabelecer os parâmetros de segurança, qualidade e eficácia dos imunobiológicos são atividades prioritárias para as autoridades sanitárias do país (MIRANDA & HENRIQUES, 2005).

As autoridades sanitárias exigem que os imunobiológicos sejam avaliados por testes de segurança (Tabela 2) e eficácia (Tabela 3) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2004).

Tabela 2: Definições dos testes de segurança biológica

Testes de segurança	
Esterilidade	Verificação da ausência de bactérias, fungos e leveduras em insumos farmacêuticos, medicamentos e correlatos
Toxicidade	Determinação da reatividade biológica inesperada e não aceitável de fármacos e medicamentos
Pirogênio	Detecção de endotoxina pelo aumento da temperatura corporal de coelhos após injeção intravenosa do produto

Fonte: FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2004

Tabela 3: Definições dos testes de eficácia

Testes de eficácia	
Identidade	Identificação do componente designado no rótulo do produto, distinguindo-o de qualquer outro componente presente no processo
Estabilidade	Capacidade da vacina em manter suas propriedades química, física, microbiológica e biológica dentro do limite de especificação
Potência	Avaliação da capacidade de um imunobiológico em induzir uma resposta imune específica

Fonte: FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2004

Nesse contexto, está inserido o INCQS, que tem como missão: “contribuir para a promoção e recuperação da saúde e a prevenção de doenças atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle de qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária” (INCQS, 2004). Cabe ao INCQS, analisar a documentação de todo o processo de produção dos imunobiológicos emitida pelo produtor e realizar os testes de segurança e de eficácia das vacinas, antes de sua liberação para o PNI.

1.6 – Ensaio de potência *in vivo* para os componentes diftérico e tetânico

Potência é a capacidade específica do produto de induzir um organismo a produzir resposta imunogênica. Em produtos combinados, como a vacina DTP, a potência de cada componente isolado não pode ser reduzida pela interação com os outros produtos, pois tal fato comprometeria sua eficácia em humanos (US FDA, CBER, 1997).

Os testes utilizados para verificar a potência dos componentes diftérico e tetânico em vacinas e soros hiperimunes preconizados na última edição da Farmacopéia Brasileira (2004), baseiam-se nos métodos de desafio (OMS) ou do método de soroneutralização (FDA/NIH). O método de desafio consiste da inoculação dos animais com diferentes diluições da vacina teste ou da vacina de referência e posterior desafio com a toxina (diftérica ou tetânica) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2004). O método de soroneutralização FDA/NIH é constituído de duas etapas (imunização e soroneutralização). Na primeira etapa, seis cobaias são imunizadas para cada lote de vacina e 4 (difteria) ou 6 (tétano) semanas após a inoculação é realizada uma punção cardíaca nesses animais para a obtenção do soro.

Antes da etapa de soroneutralização (SN), é necessário o estabelecimento da L+/10/50 da toxina utilizada no ensaio. O termo L+/10/50 refere-se à menor concentração de toxina que quando misturada a 0,1UI/mL de soro padrão e inoculada em animais, mata 50% destes. Na etapa de SN é realizada a titulação do soro proveniente do animal imunizado (vacina teste) frente à toxina específica. O resultado de potência da vacina teste é obtido a partir da comparação do desempenho desse soro animal com o do soro padrão, através da dose efetiva média calculada por análise de probitos. Geralmente, um soro padrão de trabalho nacional é produzido e sua potência é padronizada e aferida periodicamente frente a um soro de referência internacional (SRI), fornecido pela Organização Mundial de Saúde.

A etapa de SN é a que envolve maior número de animais, cerca de 80 a 90% do total utilizado no ensaio. Nesta etapa, para a análise de um único lote de vacina são utilizados 94 animais (70 camundongos para tétano e 24 cobaias para difteria). Para os soros hiperimunes antidiftérico e antitetânico, apenas é realizada a SN (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2004).

1.7 – Desenvolvimento de métodos alternativos para avaliação de potência dos componentes diftérico e tetânico

Apesar do teste de SN ser usado mundialmente, existem algumas desvantagens como, o grande número de animais utilizados, alto custo, o tempo gasto para executar o ensaio e a variação biológica, que incentivam a pesquisa e o desenvolvimento de metodologias alternativas. Vários testes imuno-químicos têm sido desenvolvidos, que podem – completa ou parcialmente – substituir o uso de animais utilizados nos ensaios de potência (Quadro 2), dentre eles estão o ELISA, Células Vero (linhagem celular derivada do rim de macaco verde), Hemaglutinação e o ToBI. O método de inibição de ligação da toxina (ToBI-*Toxin binding Inhibition*) – é um método imunoenzimático, semelhante ao ELISA, onde os soros diluídos e misturados à toxina padrão são distribuídos numa placa de 96 poços sensibilizada com anticorpo de captura anti-toxina (HENDRIKSEN et al., 1991).

O método ToBI foi desenvolvido primeiramente para avaliação da soroconversão em soro humano (HENDRIKSEN et al., 1988 e 1989a) e posteriormente utilizado para determinar o título da antitoxina diftérica no controle da qualidade devido a comprovação de sua fácil realização, sensibilidade e alta reprodutibilidade (HENDRIKSEN et al., 1989b; 1991). O ToBI para o componente tetânico foi oficialmente validado (HENDRIKSEN et al., 1994; WINSNES et al., 1999) e incluído na Farmacopéia Européia a partir da 5^a edição. Atualmente, o método ToBI é proposto para a substituição e redução no número de animais de laboratório nas etapas de fabricação e controle da qualidade das vacinas bacterianas contra tétano por algumas diretrizes internacionais (ECVAM, 2000; FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2008; WHO, 1997). O Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos (ECVAM, 2000) declarou que o ensaio imunoenzimático ToBI pode ser utilizado nos ensaios do componente tetânico visando liberação de lotes pelas autoridades regulatórias, devido à boa correlação com testes *in vivo* (HENDRIKSEN et al., 1991; MATOS et al., 2002).

Apesar de ser validado apenas para a análise do componente tetânico, o método ToBI tem se mostrado adequado também para a análise da potência do componente diftérico (HENDRIKSEN et al., 1989a; WALORY et al., 2000; MARCOVISTZ et al., 2002; SONOBE et al., 2007).

Quadro 2: Métodos alternativos *in vitro* utilizados e/ou preconizados para determinação da potência de componentes diftéricos e tetânicos

ENSAIO	COMPONENTE	REFERÊNCIA
ELISA	Tetânico Diftérico	WHO, 1997; FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2008
Células Vero	Diftérico	GUPTA et al., 1994. MARCOVISTZ et al., 2002. FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2008
Hemaglutinação	Tetânico Diftérico	Manual de métodos de laboratório (WHO, 1997)
ToBI	Tetânico Diftérico	HENDRIKSEN et al., 1988; 1989a; 1989b; 1991; MARCOVISTZ et al., 2002; MATOS et al., 2002; SONOBE et al., 2007; WALORY et al., 2000; WHO, 1997; FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2008 (tétano)

1.8 – Validação de métodos alternativos

O termo validação vem do latim *valere* que significa “ter força”. Para um método “ter força” o estudo de validação deve envolver a confiabilidade e a relevância do novo método (BALLS et al., 1990). Entretanto, o conceito de validação é considerado confuso e, dependendo do contexto ou da interpretação dos autores pode levar a diferentes conclusões (METZ et al., 2002).

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003a). A validação de uma metodologia analítica não descrita em farmacopéias ou formulários oficiais devidamente reconhecidos pela ANVISA deve respeitar os seguintes parâmetros: especificidade; linearidade; intervalo; precisão; limite de quantificação; exatidão e robustez (Tabela 4) (BRASIL, 2003a).

A fim de implementar o método ToBI no INCQS, será necessário um estudo de validação do método para o componente diftérico e um outro para o componente tetânico, antes de serem implementados na rotina do controle de vacinas e substituir os tradicionais métodos *in vivo*.

Com a realização das validações, esses métodos poderão ser utilizados não somente para a liberação de lotes de imunobiológicos destinados ao PNI, como também durante o processo de produção.

Como o ToBI é um método analítico, que ainda não está descrito na Farmacopéia Brasileira, para sua validação devem ser determinadas a especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de quantificação, exatidão e robustez.

Tabela 4: Parâmetros de validação de um método analítico

	Definição
Especificidade	capacidade de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz
Linearidade	capacidade de uma metodologia em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado
Intervalo	faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico
Repetitividade (precisão intra-ensaio)	concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação
Precisão intermediária (precisão inter-ensaios)	concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes
Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)	concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias
Limite de Quantificação	menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas
Exatidão	proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro
Robustez	medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiabilidade durante o uso normal

Referência: BRASIL, 2003a

1.9 – Justificativa

Os grupos de defesa animal e aqueles que argumentam a favor da abolição da experimentação animal têm encontrado um significativo suporte na Europa e Estados Unidos, e suas idéias têm se expandido por todo mundo. A necessidade da realização de ensaios utilizando animais tem sido seriamente questionada por diversos setores da sociedade, seja no âmbito político, social, ético ou científico. Neste quadro, pode-se dizer que as indústrias químicas e farmacêuticas, ou mesmo órgãos governamentais de regulamentação e controle da qualidade, estão sob crescente pressão para substituir a experimentação animal por métodos que não utilizem animais (METZ et al., 2002).

Esta tendência internacional vem se tornando crescente também no Brasil, que busca seguir o princípio dos 3Rs (*Replacement, Reduction e Refinement*), introduzidos por Russel e Burch em 1959, onde: Substituição (*replacement*) refere-se à substituição de animais superiores conscientes por materiais inanimados ou insensíveis. Redução (*reduction*) significa a diminuição de animais utilizados para se obter informações com quantidade e precisão adequadas. Refinamento (*refinement*) refere-se a qualquer diminuição da incidência de severidade de procedimentos desumanos aplicados a animais que ainda tenham que ser utilizados (RUSSEL & BURCH, 1959).

Nas décadas recentes, o uso do princípio dos 3Rs também tem sido reconhecido pelos órgãos reguladores (como a Farmacopéia Européia e FDA) e várias autoridades internacionais, tendo sido incorporado em monografias e normas. Vários testes com relevância questionável foram removidos das monografias da Farmacopéia Européia ou são realizados apenas durante o processo produtivo.

O INCQS é um órgão público federal de caráter técnico-científico, que atua em todo território nacional atendendo ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNSV) e interage com organizações internacionais vinculadas à qualidade de produtos ofertados à população através da análise documental do registro, processo de produção e da realização de testes de segurança e eficácia em imunobiológicos (BRASIL, 2003b).

Para determinar a potência dos componentes diftérico, tetânico e pertussis presentes em vacinas e soros hiperimunes como preconizado pela Farmacopéia Brasileira, o Setor de Vacinas Bacterianas (SVB) do INCQS utilizou no período de 2005 a 2008 cerca de 20.000

animais (Tabela 5). Nesse período foram recebidos 754 lotes, dentre eles soro antidiftérico e antitetânico e vacinas duplo adulto (dT), duplo infantil (DT), tríplice bacteriana (DTP), tetravalente (DTP Hib), pentavalente (DTP-Hepatite B-Hib) e DTP acelular. As vacinas DTP Hib (54%), dT (18%), DTP (13%) e o soro antitetânico (11%) representaram o maior percentual de produtos analisados (Figura 2). Dentre eles, 242 foram efetivamente testados através de ensaio *in vivo*, devido a alguns produtos estarem no sistema de aleatoriedade².

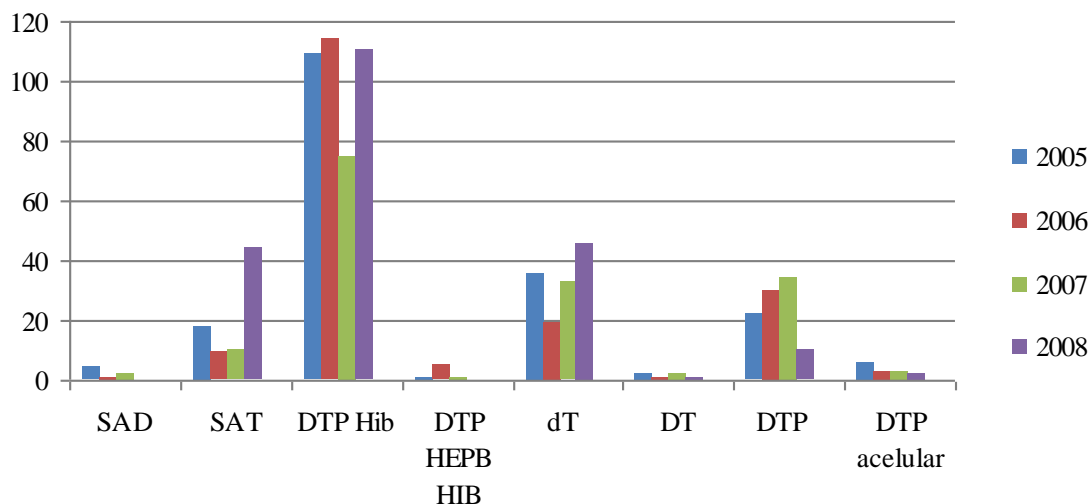


Figura 2: Número de lotes de produtos analisados pelo Setor de Vacinas Bacterianas entre 2005 e 2008

Como o ToBI já é utilizado em instituições internacionais e preconizado pela Farmacopéia Européia para controle de potência do componente tetânico (FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2008), com a possibilidade de ser aplicado também ao componente diftérico (HENDRIKSEN et al., 1989b; MARCOVITZ et al., 2002; SONOBE et al., 2007; WALORY et al., 2000), a padronização dessa metodologia no INCQS, além de permitir a consonância com as metodologias internacionais, também irá satisfazer algumas das atividades de desenvolvimento tecnológico, como o desenvolvimento, validação e/ou implantação de novas metodologias analíticas através de organização, coordenação e padronização de programas interlaboratoriais e estabelecimento de materiais de referência (INCQS, 2004). Uma vez que o INCQS é reconhecido

² O sistema de aleatoriedade foi determinado através do consenso do INCQS, ANVISA e produtor, baseado na homogeneidade dos resultados e ausência de reprovação ao longo dos anos, podendo ser suspensa quando houver reprovação de amostra.

internacionalmente como o único centro de referência em validação de métodos alternativos ao uso de animais na América Latina (ALTWEB, 2010).

Tabela 5: Número de lotes ensaiados e animais utilizados para análise de potência dos componentes diftérico e tetânico entre 2005 e 2008 no Setor de Vacinas

PRODUTO		2005	2006	2007	2008
DTP	lotes	8	9	9	3
	camundongos	560	630	630	210
	cobaias	192	216	216	72
dT	lotes	4	2	9	12
	camundongos	280	140	630	840
	cobaias	96	48	216	288
DT	lotes	1	1	1	1
	camundongos	70	70	70	70
	cobaias	24	24	24	24
DTP Hib	lotes	20	14	19	28
	camundongos	1400	980	1330	1960
	cobaias	480	336	456	672
DTP acelular	lotes	6	0	3	2
	camundongos	420	0	210	140
	cobaias	144	0	72	48
DTP Hepatite B Hib	lotes	1	0	1	0
	camundongos	70	0	70	0
	cobaias	24	0	24	0
Soro Antidiftérico	lotes	4	1	2	0
	cobaias	96	24	48	0
Soro Antitetânico	lotes	18	9	10	44
	camundongos	1260	63	700	3080
Total lotes analisados		62	36	54	90
Total animais utilizados		5116	2531	4696	7404

Nesse contexto, a substituição do método de rotina pelo ToBI permitiria uma redução de 90% do número de animais utilizados (Tabela 6) e, conseqüentemente, menor custo e maior agilidade na liberação de lotes. Dessa maneira, o presente estudo pode contribuir para a adoção das metodologias alternativas aos testes *in vivo*, atualmente empregados no laboratório oficial de controle da qualidade de imunobiológicos, e pelos produtores nacionais. Assim como, permitirá sua posterior incorporação na Farmacopéia Brasileira.

Tabela 6: Número de animais utilizados por ensaio

	<i>IN VIVO</i>		ToBI	
	Imunização	Soroneutralização	Imunização	Soroneutralização
Difteria	6 cobaias	24 cobaias	6 cobaias	0
Tétano	6 cobaias	70 camundongos	6 cobaias	0
Total	6 animais*	94 animais	6 animais*	Nenhum animal

Fonte: ECVAM, 2000; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2004; FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2008; WHO, 1997. * Os mesmos animais podem ser utilizados para a análise de potência de difteria e tétano.

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Padronizar e validar o método *in vitro* de inibição de ligação da toxina (ToBI) para reduzir o número de animais utilizados nos ensaios de controle de potência dos componentes diftéricos e tetânicos em amostras de vacinas e soros hiperimunes.

2.2 - Objetivos Específicos

- i) titular os reagentes utilizados no teste ToBI para determinar as concentrações ótimas ao teste;
- ii) estabelecer os limites de confiança através dos gráficos de controle de processo para os controles positivo e negativo do ToBI;
- iii) avaliar a variabilidade do teste através da determinação da especificidade, linearidade, precisão (intra-ensaio e inter-ensaio), limites de quantificação e detecção;
- iv) avaliar possível interferência de componentes do soro de cobaias utilizado no ensaio;
- v) determinar potência do componente tetânico presente em vacinas utilizando amostra de soro animal colhido na quarta semana após a imunização;
- vi) correlacionar resultados de potência determinados pelo teste ToBI com os determinados pelo produtor em testes *in vivo*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A avaliação da variabilidade do teste ToBI para determinar a potência dos componentes diftérico e tetânico presentes em vacinas e soros antidiftéricos e antitetânicos foi conduzida através de diferentes etapas: obtenção e seleção de soros de cobaias e equino (imunoglobulina purificada) a serem analisados, obtenção e titulação dos reagentes (anticorpos conjugados, soros de captura, soros de referência e toxinas), padronização das diferentes etapas do método, cálculo dos limites de confiança para os controles positivo e negativo e determinação dos parâmetros de validação.

3.1 – Amostras de soros, toxinas e reagentes

Foram utilizados para cada componente (diftérico e tetânico), os soros de referência internacional (SRI) e nacional (SRN), soro equino antidiftérico (SAD) ou antitetânico (SAT) e soro de cobaias imunizadas com vacinas dT ou DTP Hib (soro teste).

As toxinas foram fornecidas pelo Instituto Butantan com concentrações de 100 Lf/mL (diftérica) e 1380Lf/mL (tetânica), os conjugados e os soros de captura foram fornecidos por Biomanguinhos, o TMB e o peróxido adquiridos da SIGMA®.

3.1.1 - Soros de referência nacional (SRN) e internacional (SRI)

Os soros de referência internacional antidiftérico e antitetânico foram fornecidos pelo NIBSC (*National Institute for Biological Standards and Control* – Hertfordshire, United Kingdom) com potência previamente determinada em estudos interlaboratoriais de diversos países. Os SRN antidiftérico e antitetânico são os soros de trabalho utilizados nos ensaios *in vivo* para determinar a potência dos componentes diftérico e tetânico presente em soros e vacinas no INCQS e foram usados como padrões nos ensaios *in vitro*.

Os soros de referência nacionais foram produzidos no INCQS, a partir de um *pool* de soros comerciais de diferentes produtores nacionais, sendo acondicionados em frascos

com potência de 1000 UI/mL e posteriormente liofilizados. Para a utilização, o conteúdo de cada frasco é ressuspendido com solução salina 0,85 % enriquecida com 1% de peptona e 60 % de glicerol, de modo a obter 10 UI/mL. O SRN tem a sua potência periodicamente determinada *in vivo* após aferição frente ao soro internacional. A potência do soro de referência nacional antidiftérico é de 9,8 UI/mL e do soro antitetânico é de 10 UI /mL.

3.1.2 - Soros eqüinos hiperimunes (Soro hiperimune)

Para avaliar a capacidade do método em detectar anticorpos específicos presente em soro purificado, foram selecionados quatro lotes de soro antitetânico (SAT) e quatro lotes de soro antidiftérico (SAD) procedentes de produtores nacionais. Esses soros são purificados a partir do plasma de eqüinos hiperimunizados e contêm anticorpos específicos contra toxina tetânica e toxina diftérica, respectivamente. A potência mínima de cada soro preconizada pela Farmacopéia Brasileira (Farmacopéia Brasileira, 2004) é de 1000 UI/mL. Devido à alta potência desse material quando comparado aos demais produtos, fez-se necessário realizar uma diluição prévia (1:500) para ajustá-lo à potência induzida pelas vacinas (em torno de 2 UI/mL).

3.1.3 - Soro de animais imunizados com as vacinas dT e DTP Hib

3.1.3.1 - Animais

Na etapa de imunização foram utilizadas cobaias (*Cavia porcellus*) com massa entre 450 e 550g, preferencialmente do mesmo sexo, procedentes do Centro de Criação de Animais de Laboratório/FIOCRUZ e aclimatados no Serviço de Animais de Laboratório/INCQS por um período de pelo menos 24 horas. A licença para o uso desses animais está registrada no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA - FIOCRUZ) sob o número P. 0135/02.

3.1.3.2 - Amostras testadas

Para avaliar a capacidade do método em detectar anticorpos específicos presente em soro de cobaias imunizadas, foram testados dois lotes de vacinas dT e dois lotes de vacina DTP Hib de dois produtores nacionais (Biomanguinhos e Instituto Butantan). Essas amostras foram liberadas para o uso pelo PNI seguindo os critérios estabelecidos por normas oficiais. A potência foi previamente determinada *in vivo* pelo produtor e pelo laboratório nacional de controle (INCQS). A potência mínima preconizada pela Farmacopéia Brasileira do componente tetânico é de 2,0UI/mL para todas as vacinas bacterianas e para o componente diftérico é 0,5 UI/mL para a vacina dT e 2,0 UI/mL para a vacina DTP Hib (Farmacopéia Brasileira, 2004).

3.1.3.3 - Imunização das cobaias e obtenção de soro (componente diftérico e tetânico)

A imunização das cobaias seguiu o preconizado pela Farmacopéia Brasileira para determinação da potência dos componentes tetânico e diftérico, presentes nas monografias “VACINA ANTIDIFTÉRICA E ANTITETÂNICA ADSORVIDA USO INFANTIL (DT) *Vaccinum diphtheriae et tetani adsorbatum*” e TOXÓIDE TETÂNICO ADSORVIDO *Toxoidum tetanicum adsorbatum*” (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2004).

Para cada lote de vacina testada, foram inoculadas 6 cobaias com a metade da dose total humana (0,75 mL) por via subcutânea (SC), utilizando seringa de 1 mL e agulha 13 x 4,5 mm. Ao final de quatro (difteria) e seis (tétano) semanas, pelo menos 4 cobaias que apresentaram ganho de peso foram previamente anestesiadas utilizando éter e sangradas através de punção cardíaca utilizando seringa de 10 mL e agulha 40 x 1,2 mm. O sangue foi depositado em tubos 13 x 100 mm e incubado a $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos para a coagulação e retração. Após a incubação, o sangue foi centrifugado a 2.000 r.p.m. por 10 minutos e o *pool* dos soros dos animais de cada lote foi estocado separadamente à temperatura de -20°C . Esses soros foram utilizados para a determinação de potência através da SN *in vivo* e pelo método ToBI.

3.1.4 – Toxina tetânica e toxina diftérica

As toxinas utilizadas no presente estudo são de fabricação nacional. Para cada toxina foi realizada a determinação da L+/10/50, ou seja, a dose capaz de matar 50 % dos animais em até 96 horas quando misturada com 0,1 UI de soro referência internacional. Essa dose é utilizada para a realização do ensaio *in vivo*, mas também serviu para determinar o intervalo a ser testado durante a etapa de titulação do método ToBI. A partir desse intervalo foi realizada, durante a etapa de titulação, uma curva dose-resposta da toxina e foi definida a diluição da toxina (controle positivo) que apresentava uma densidade óptica (D.O.) próxima a 1,0 para os ensaios subseqüentes.

3.1.4.1 - Estabelecimento da L+/10/50 da toxina diftérica

Para o estabelecimento da L+/10/50 da toxina diftérica foram utilizadas 4 cobaias (250 a 350g) por diluição. Foram distribuídos em tubos 13x100mm volumes variados (fator de diluição aproximado 1,3) de toxina diftérica e volumes constantes de soro padrão antidiftérico (1UI/mL), de modo que cada animal fosse injetado com 0,1UI/mL de soro. O volume dos tubos foi igualado para 5,0 mL com solução salina contendo 1% de peptona e em seguida incubados à $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 60 minutos. Em cada cobaia foi administrado por via SC um volume de 1 mL de cada diluição, utilizando seringa de 1mL e agulha de 13 x 4,5. Os animais foram observados durante 96 horas e o número de animais sobreviventes em cada mistura foi registrado. A menor quantidade de toxina, que causou 50% de mortalidade nos grupos de animais em 96 horas, foi escolhida para as etapas subseqüentes.

3.1.4.2 - Estabelecimento da L+/10/50 da toxina tetânica

Para o estabelecimento da L+/10/50 da toxina tetânica foram utilizados 10 camundongos (*Mus musculus*), com massa entre 17 a 22g, por diluição. Foram distribuídos em tubos 13 x 100mm volumes variados (fator de diluição aproximado 1,05) de toxina tetânica e volumes constantes de soro padrão antitetânico (1UI/mL), de modo que cada animal fosse injetado com 0,1UI/mL de soro. O volume dos tubos foi igualado para 3,0 mL

com solução salina contendo 1% de peptona e em seguida incubados à $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 60 minutos. Em cada camundongo foi administrado por via SC um volume de 0,2 mL de cada diluição, utilizando seringa de 1mL e agulha de 13 x 4,5mm. Os animais foram observados durante 96 horas e o número de animais sobreviventes em cada mistura foi registrado. A menor quantidade de toxina, que causou 50% de mortalidade nos grupos de animais em 96 horas, foi escolhida para as etapas subsequentes.

3.2 – Teste de inibição de ligação da toxina - ToBI (*Toxin Binding Inhibition*)

O ToBI é um ensaio imunoenzimático desenvolvido para estimar a quantidade de antitoxinas diftérica ou tetânica em amostras de soro. O ToBI se divide em duas etapas: a) soroneutralização (Fase 1) – incubação da mistura de soro teste em diferentes concentrações e toxina em placas de 96 poços; b) reação imunoenzimática (Fase 2) – captura da toxina não neutralizada pelo soro na fase anterior (soroneutralização), em uma nova placa sensibilizada com antitoxina específica. Em seguida, o anticorpo antitoxina conjugado à peroxidase é adicionado e a reação é revelada. Dessa maneira, a leitura em DO é inversamente proporcional à potência de vacinas e soros hiperimunes, ou seja, quanto menor a capacidade do soro em neutralizar a toxina, maior a DO.

3.2.1 - Titulação cruzada dos reagentes (diftérico e tetânico)

A titulação de reagentes se faz necessária para determinar as concentrações de soro de captura, de anticorpo conjugado e de toxina adequadas ao teste.

O anticorpo de captura antidiftérico ou antitetânico foi diluído para 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em tampão carbonato com 0,02 % de azida sódica (pH 9,6). Com o auxílio de uma pipeta multicanal, foi adicionado 100 $\mu\text{l}/\text{poço}$ dessa solução em todos os 96 orifícios de uma placa de poliestireno de fundo chato. Em seguida, esta placa foi coberta com filme adesivo e incubada a temperatura de 2 a 8°C por cerca de 18 horas.

No dia seguinte, a placa foi lavada duas vezes com tampão de lavagem, composto de salina tamponada com fosfato (PBS) e 0,05% de Tween 20, em lavador de placas automático (Bio-Tek EL_X50). Foi efetuado bloqueio de sítios inespecíficos através da

adição de 200 µl/poço da solução de albumina sérica bovina (BSA) a 1% em PBS (pH 7,2). A placa foi coberta e incubada a 37°C por 60 min.

Em paralelo, foi preparada uma solução de toxina diftérica ou tetânica na concentração de 0,5 Lf/mL em PBS (pH 7,2) e realizadas diluições seriadas (fator 2) a partir desta. Após a lavagem da placa foram distribuídos 100 µl das diferentes diluições de toxina em cada poço. A placa foi novamente coberta com filme adesivo e incubada à 37°C por 90 min.

O anticorpo antitetânico e antidiftérico, ambos conjugados a peroxidase, foram diluídos 1:500 a 1:16000 (fator 2) em solução PBS com 0,1% de BSA e 0,05% de Tween 20. Após a lavagem das placas, foram adicionados 100 µl/poço das diluições do anticorpo conjugado, a placa foi coberta e incubada à temperatura ambiente sob abrigo da luz por 2 horas.

Em seguida, a placa foi lavada e 100 µl da solução de substrato (tampão acetato de sódio a 0,011 M - pH 5,5, 1,67 % de tetrametilbenzidina - TMB 0,025M em etanol absoluto p.a. e 0,03 % de peróxido de hidrogênio-H₂O₂) foi adicionada em cada cavidade. A placa foi mantida à temperatura ambiente e sob abrigo da luz por 15 minutos e então a reação foi interrompida adicionando-se 100 µl/poço de solução de ácido sulfúrico a 2 M. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de ELISA (Bio-Tek EL_X 800) a um comprimento de onda de 450 nm.

3.2.2 - Método ToBI

3.2.2.1 - Soroneutralização (FASE 1)

Após a identificação de uma microplaca de poliestireno de fundo redondo, foram adicionados 200 µl de solução de bloqueio (BSA 1% em PBS - pH 7,2) em cada poço. A placa foi incubada por 60 minutos a 37°C em câmara úmida e em seguida foi lavada duas vezes em lavador de placas com solução de lavagem (PBS com 0,05% de Tween 20).

Como demonstrado na figura 3, foi distribuído 100 µl de PBS (pH 7,2) nos poços das linhas B até G e 200 µl dos diferentes soros na linha A. Em seguida, foi realizada uma diluição seriada (fator 2) até a linha G, de onde foram descartados 100 µl para igualar os

volumes. Em todos os poços, com exceção aos da linha H, foram adicionados 100 µl de toxina (diftérica ou tetânica) diluída em PBS (pH 7,2), na concentração de 0,125 Lf/mL. Os poços da linha H (1-6) contendo somente PBS foram reservados para o controle negativo e os poços H (7-12) contendo somente a toxina (0,125Lf/mL) foram reservados para o controle positivo (100% de absorvância). A placa foi incubada por 37°C durante 60 minutos e em seguida foi colocada na geladeira (4°C) por no mínimo 12 horas (figura 4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	SRI		SRN		Soro 1		Soro 2		Soro 3		Soro 4	
A	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8
B	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16
C	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32
D	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64
E	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128
F	1/256	1/256	1/256	1/256	1/256	1/256	1/256	1/256	1/256	1/256	1/256	1/256
G	1/512	1/512	1/512	1/512	1/512	1/512	1/512	1/512	1/512	1/512	1/512	1/512
H	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

SRI: Soro Referência Internacional; SRN: Soro de Referência Nacional;
 Controle negativo (-): PBS puro; Controle positivo (+): toxina a 0,125Lf/mL

Figura 3: Esquema de distribuição dos soros na placa

3.2.2.2 - Reação Imunoenzimática (FASE 2)

Uma placa de 96 poços de fundo chato foi revestida com 100 µl/poço de antitoxina (difétrica ou tetânica) a 20 µg/mL e incubada a 4°C por no mínimo 12 horas em câmara úmida. Após incubação, a placa foi lavada duas vezes com solução de lavagem (PBS com 0,05% de Tween 20) e bloqueada com 200 µl/poço de BSA 1% em PBS (pH 7,2) durante 60 min a 37°C em atmosfera úmida.

Posteriormente, a placa foi lavada duas vezes e 100 µl da mistura da placa da Fase 1 (SN) foram transferidos para os respectivos poços desta placa que continha anticorpo de captura fixado. Esta placa foi incubada por 90 minutos a 37°C em atmosfera úmida.

Após a lavagem das placas, foram adicionados 100 µl/poço da solução do anticorpo conjugado diluído 1:4000 (difteria) ou 1:2000 (tétano) em PBS com 0,1% de BSA e 0,05% de Tween 20. A placa foi coberta e incubada à temperatura ambiente sob abrigo da luz por 120 minutos.

Em seguida, a placa foi lavada e 100 µl da solução de substrato (tampão acetato de sódio 0,011 M - pH 5,5, 1,67 % de tetrametilbenzidina - TMB 0,025M em etanol absoluto p.a. e 0,03 % de peróxido de hidrogênio-H₂O₂) foram adicionados em cada cavidade. A placa foi mantida à temperatura ambiente e sob abrigo da luz por 15 minutos e então a reação foi interrompida adicionando-se 100 µl/poço de solução de ácido sulfúrico a 2 M. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de ELISA (Bio-Tek EL_X 800) a um comprimento de onda de 450 nm (Figura 4).

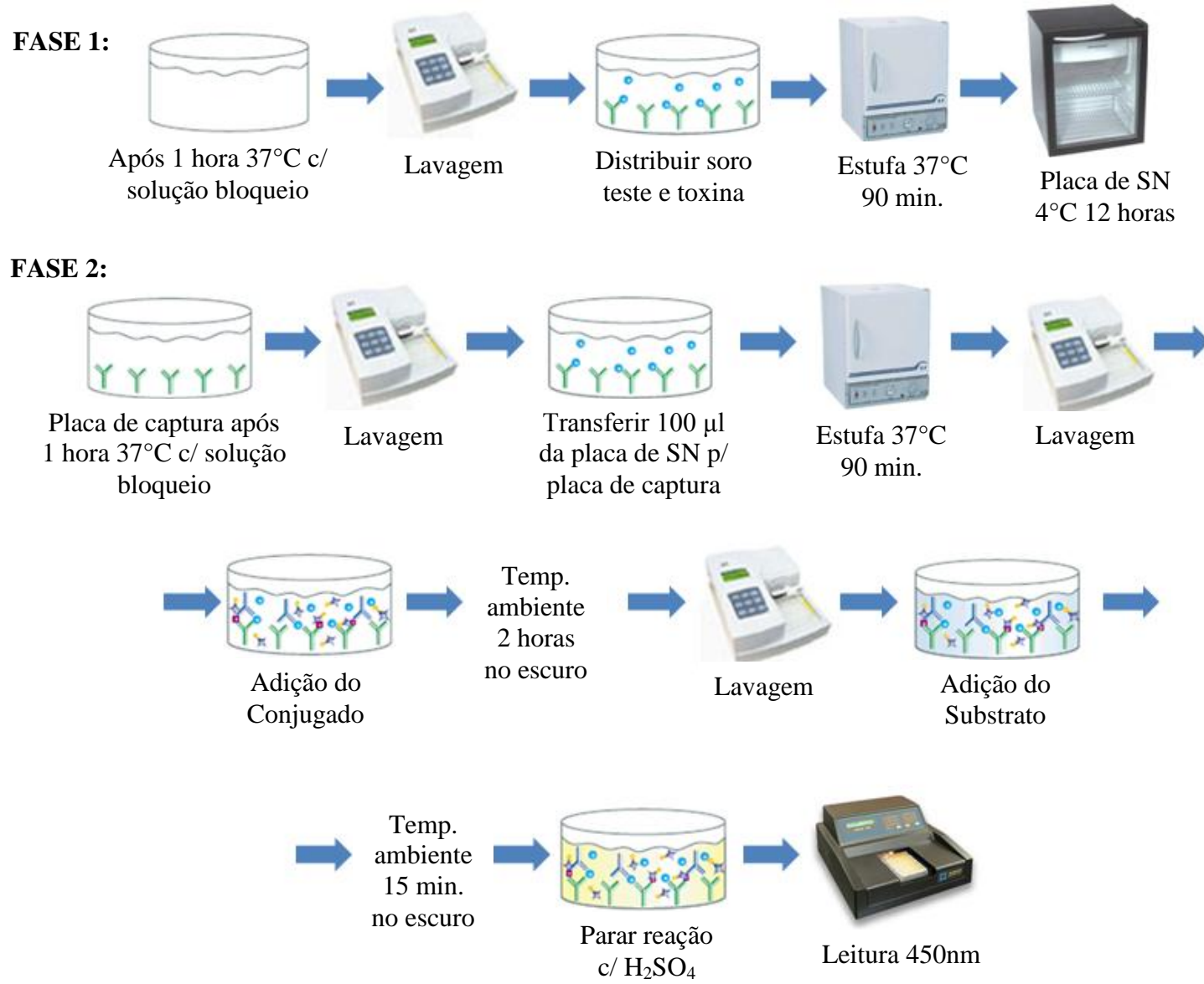


Figura 4: Esquema resumido do procedimento do teste ToBI

3.3 – Limites de Confiança para os Controles Positivo e Negativo

Os limites de confiança (ou de controle) foram estabelecidos a partir do cálculo de 3 DP e os limites de alerta, em 2 DP, após a realização de 20 ensaios como definidos pela OMS (WHO, 1997). Esses gráficos de controle foram confeccionados e os testes de *performance* realizados utilizando o programa SPC Explorer RT, versão 5.21 (Quality America Inc.)

Os eixos dos gráficos foram formados pelo tempo (abscissa) e pela absorbância (ordenada). As linhas horizontais do gráfico consistem da média das absorbâncias do controle positivo e negativo e dos limites superiores e inferiores, calculados a partir da média adicionada de 2 desvios-padrão (DP) e média mais 3 DP. Os limites inferiores foram calculados a partir da média subtraída de 2 DP e 3 DP. As médias, os desvios-padrão e, conseqüentemente os limites foram calculados a partir de 20 ensaios. Os limites de 2 DP são considerados limites de alerta e os de 3 DP, limites de rejeição do ensaio. Após cada ensaio, os valores foram imediatamente adicionados ao gráfico e submetidos aos testes de *performance*.

Os testes de *performance* verificaram a ocorrência de:

- a) um valor além dos limites de confiança superior ou inferior (3DP);
- b) nove valores consecutivos no mesmo lado da média;
- c) seis valores consecutivos ascendentes ou descendentes;
- d) dois de três valores consecutivos além dos limites de alerta superior ou inferior (2 DP).

Os ensaios que produziram valores acima do limite superior de 3DP ou abaixo do limite inferior de 3DP foram considerados inválidos e não foram utilizados para as demais etapas de validação do presente estudo.

3.4 – Parâmetros de Validação

3.4.1 – Especificidade

A especificidade demonstra a capacidade de seleção entre compostos com estruturas semelhantes e pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras contaminadas e amostras não contaminadas. Os resultados da amostra não podem ser afetados por esses materiais. Nesse estudo, a especificidade foi avaliada através da comparação da soroneutralização de soro e toxina específica³ com a soroneutralização de soros e toxina específicos na presença de uma toxina inespecífica⁴, para comprovação da ligação somente da toxina específica (Figura 5). A diferença entre os grupos foi analisada através do método estatístico ANOVA ($p > 0,05$).

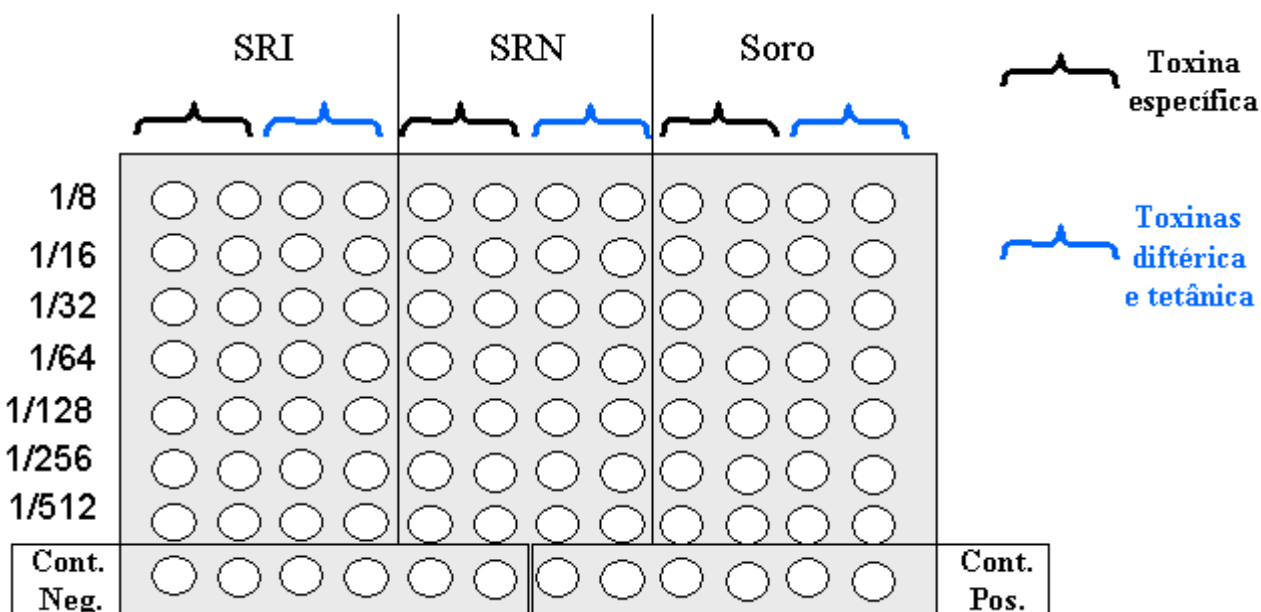


Figura 5: Distribuição dos diferentes soros na placa com 2 condições de toxina: somente a toxina específica (diftérica ou tetânica) e as duas toxinas misturadas

³ Específica: toxina diftérica, se a placa de captura estiver sensibilizada com soro antidiftérico; ou toxina tetânica, se a placa de captura estiver sensibilizada com soro antitetânico.

⁴ Inespecífica: toxina diftérica, se a placa de captura estiver sensibilizada com soro antitetânico; ou toxina tetânica, se a placa de captura estiver sensibilizada com soro antidiftérico.

Para comprovar a ausência de ligação inespecífica, foram realizados também dois ensaios para o componente diftérico e dois para o componente tetânico utilizando toxina inespecífica como controle negativo e comparando seu resultado com o controle negativo (PBS). As diferenças entre os grupos foram analisadas através do método estatístico ANOVA ($p>0,05$).

3.4.2 – Linearidade

Para a determinação da linearidade foram realizadas 11 diluições sucessivas dos SRI e 15 diluições do SRN. O coeficiente de correlação foi determinado através do gráfico da absorbância (eixo das ordenadas) pelo log (eixo das abscissas) da diluição. Além disso, a linearidade e o paralelismo foram avaliados em cada ensaio, sendo considerados quesitos para verificar a validade dos resultados.

3.4.3 – Precisão

A precisão de um método é avaliada de diferentes maneiras: análise da repetitividade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade e pode ser expressa como coeficiente de variação percentual (CV%).

A repetitividade (precisão intra-ensaio) foi avaliada para cada um dos 3 dias de ensaios e para as diferentes amostras. O CV% foi calculado a partir de 7 diluições seriadas e em duplicata para cada amostra, dentre elas: um soro de referência internacional (SRI), um soro de referência nacional (SRN), quatro soros hiperimunes de diferentes lotes (SH) e quatro soros de animais imunizados com diferentes lotes de vacina (SA). O CV% foi obtido a partir da razão entre a raiz da média das variâncias pela média das diluições multiplicada por 100. Os valores de precisão devem ficar abaixo dos limites considerados aceitáveis, tanto precisão intra-ensaio (CV<10%) quanto precisão inter-ensaio (CV<20%), para indicar boa repetitividade do método segundo agências regulatórias (AOAC, 2000).

A precisão intermediária (precisão inter-ensaios) foi analisada tendo como variável além do dia de ensaio ($n = 3$), o analista do ensaio ($n=2$). Para cada amostra testada (SRI, SRN, quatro lotes de SH e quatro lotes de SA) foi avaliado o CV% em três dias de ensaios.

O CV% foi obtido a partir da razão entre a raiz da média das variâncias (entre os 3 dias) pela média obtida nos diferentes dias multiplicada por 100.

3.4.4 - Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) foi estabelecido por meio da análise de concentrações conhecidas e decrescentes do analito até o menor nível detectável pelo ensaio. Esse parâmetro foi calculado conforme guias oficiais (AOAC, 2000) para cada componente (diftérico e tetânico) a partir do valor médio do controle negativo (PBS) adicionado de 3 desvios padrão (DP) em 30 ensaios.

$$\text{LD} = \text{Média do controle negativo} + 3 \text{ DP}$$

3.4.5 - Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi estabelecido por meio da análise de concentrações decrescentes do analito até o menor nível determinável com precisão e exatidão. Esse parâmetro foi calculado conforme guias oficiais (AOAC, 2000) para cada componente (diftérico e tetânico) a partir do valor médio do controle negativo (PBS) adicionado de 10 desvios padrão (DP) em 30 ensaios. O LQ foi determinado também para cada componente.

$$\text{LQ} = \text{Média controle negativo} + 10 \text{ DP}$$

3.5 – Avaliação da possível interferência de componentes do soro animais

Com o objetivo de descartar a possibilidade de algum componente no soro desses animais interferir em algum tipo de ligação ao longo das etapas. Foram realizados quatro ensaios com soro de animais não imunizados em diferentes dias com diluição de 1:2 para o soro animal e oito diluições seriadas das toxinas com fator de diluição de 1,2 partindo da concentração de 0,20 LF/mL. Os dois controles positivos do componente diftérico e os outros dois para o componente tetânico foram distribuídos de maneira que um controle de cada componente foi diluído em PBS e o outro controle foi diluído em soro de animal não imunizado. Além disso, foram distribuídos dois controles negativos, sendo um o PBS e o outro soro de animal não imunizado conforme figura 6. Os resultados de DO foram analisados através do método estatístico ANOVA ($p > 0,05$).

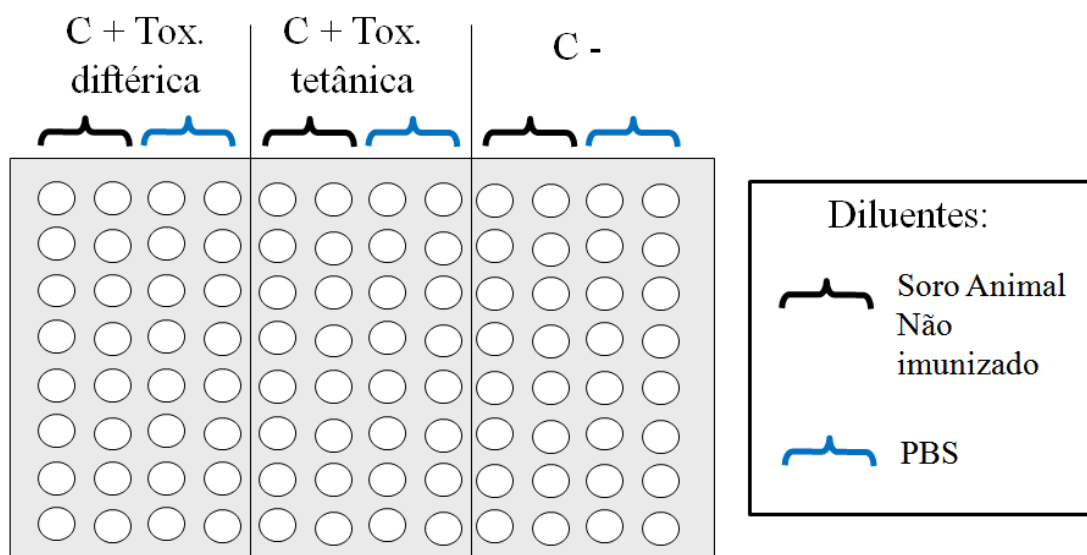


Figura 6: Distribuição dos controles positivos das duas toxinas e do controle negativo em dois tipos de diluentes (PBS e soro animal não imunizado)

3.6 – Única sangria para potência diftérica e tetânica

É preconizado pela Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2004) a utilização de soro animal de sangria feita 4 semanas após imunização para componente diftérico (primeira sangria) e 6 semanas após imunização para componente tetânico (segunda sangria). Dessa maneira é necessário que os animais permaneçam mais duas semanas após a primeira sangria para que uma outra punção seja realizada. Nesse experimento foi avaliada a possibilidade de utilizar soro de uma mesma sangria para determinar potência de ambos componentes (diftérico e tetânico).

Foi realizado ensaio ToBI sendo que na etapa de soroneutralização (fase 1) foram utilizadas cinco amostras de soro animal de primeira sangria (4 semanas após a imunização) em contato com toxina tetânica. O resultado foi comparado com o mesmo ensaio utilizando cinco amostras de soro animal de segunda sangria (6 semanas após a imunização) através do método estatístico ANOVA ($p > 0,05$). Este experimento foi repetido em cinco diferentes dias.

Cabe ressaltar que a utilização do método estatístico ANOVA somente é possível caso os resultados apresentem distribuição normal. A normalidade dos resultados foi testada pelo método Kolmogorov-Smirnov.

3.7 – Correlação entre os resultados de potência do ensaio ToBI com o produtor

Para correlacionar os resultados de potência dos componentes diftéricos e tetânicos do ensaio ToBI com os valores de potência fornecidos pelo produtor, foram realizados seis ensaios com quatro amostras de vacina diftérica e nove amostras para componentes tetânicos. A potência de cada amostra em cada ensaio foi determinada por análise de linhas paralelas, utilizando o software Combstat® v.4.0. A média aritmética de cada amostra entre os seis dias foi calculada e correlacionada com os respectivos valores de potência do produtor, utilizando o software Minitab® v.14 para calcular o coeficiente de correlação de Pearson.

4. RESULTADOS

4.1- Determinação da L+/10/50 *in vivo*

4.1.1- Toxina Diftérica

A determinação da L+/10/50⁵ da toxina diftérica foi realizada através da mistura de diferentes volumes da toxina diluída frente ao soro de referência 0,1 UI/mL. O resultado de L+/10/50 foi obtido após quatro experimentos realizados em diferentes dias. A média desses experimentos, calculada por probitos, foi 0,313 Lf/mL para a toxina diftérica (Tabela 7).

4.1.2- Toxina Tetânica

A determinação da L+/10/50 da toxina tetânica foi realizada a partir do resultado obtido em cinco experimentos realizados em diferentes dias. A média desses experimentos foi 0,487 Lf/mL (Tabela 7).

Tabela 7: Valores de L+/10/50 das toxinas diftérica e tetânica no ensaio de soroneutralização *in vivo*

Toxina	Concentração inicial	Diluição prévia	Valor médio de L+/10/50
Diftérica (n=4)	100 Lf/mL	1:30	0,313 ± 0,000 Lf/mL
Tetânica (n=5)	1380 Lf/mL	1:80	0,487 ± 0,017 Lf/mL

n – número de experimentos realizados para cada toxina. Valores de L+/10/50 expressos como média dos experimentos realizados ± desvio padrão

⁵ Conforme mencionado anteriormente, L+/10/50 refere-se à menor concentração de toxina que quando misturada a 0,1UI/mL de soro padrão e inoculada em animais, mata 50% destes.

4.2 - Titulação dos reagentes para ToBI

4.2.1 - Componente diftérico

O anticorpo antidiftérico conjugado à peroxidase foi titulado nas diluições de 1:500 a 1:8000 frente à concentração de soro de captura antidiftérico de 20 µg/mL (Figura 7). O manual de métodos laboratoriais da OMS (WHO, 1997) preconiza para o teste de potência de vacinas, que os valores máximos de absorvância estejam entre 0,6 e 1,5. Como observado na figura 7 a maior diluição de conjugado que melhor se ajustou a esse critério da OMS foi a de 1:8000.

Paralelamente à titulação do anticorpo conjugado, foram testadas concentrações de toxina diftérica próximas ao valor encontrado na etapa de estabelecimento da L+/10/50 (tabela 7). As concentrações de toxina diftérica (0,125 e 0,500 Lf/mL) não mostraram diferenças significativas quanto aos valores de absorvância obtidos (Figura 7). Dessa maneira, a menor concentração (0,125 Lf/mL) foi escolhida para as etapas da validação.

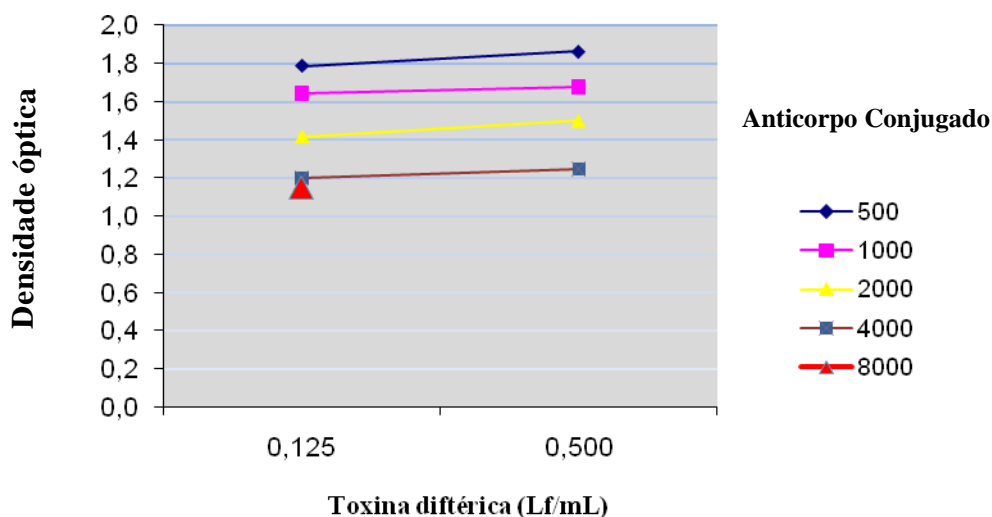


Figura 7: Titulação da toxina diftérica e do anticorpo conjugado à peroxidase utilizando soro de captura antidiftérico (20 µg/mL)

4.2.2 - Componente tetânico

O anticorpo antitetânico conjugado à peroxidase foi titulado nas diluições de 1:500 a 1:16000 frente à concentração de anticorpo de captura antitetânico de 20 µg/mL (Figura 8). Como podemos observar, a maior diluição de conjugado que melhor se ajustou aos critérios da OMS (WHO, 1997) foi a de 1:4000.

As concentrações de toxina tetânica também foram testadas concomitantemente à titulação do anticorpo conjugado, baseando-se nos valores encontrados na etapa de estabelecimento da L+/10/50. As concentrações (0,125, 0,250 e 0,500 Lf/mL) não mostraram diferenças significativas quanto aos valores de absorbância obtidos. Da mesma maneira que para a toxina diftérica, foi escolhida a menor concentração (0,125 Lf/mL) para as etapas da validação (Figura 8).

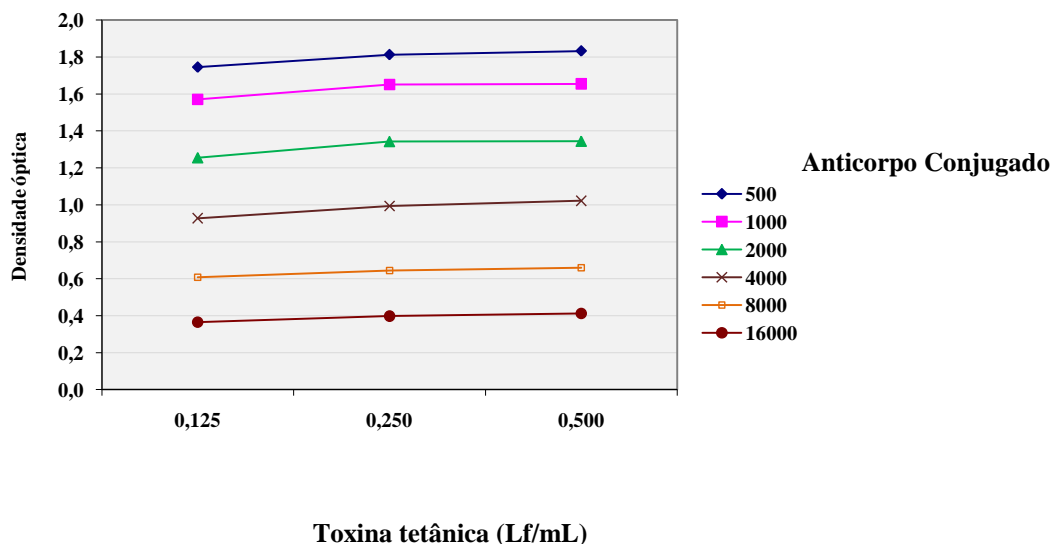


Figura 8: Titulação da toxina tetânica e do anticorpo conjugado à peroxidase utilizando soro de captura antitetânico (20 µg/mL)

4.3 – Avaliação dos parâmetros de validação do ToBI

Para utilização do método estatístico ANOVA nas etapas de validação foi necessário verificar se os resultados apresentavam distribuição normal. Após análise da normalidade dos resultados – testada pelo método Kolmogorov-Smirnov – foi observado que todas as amostras ficaram dentro do nível de significância (0,05), caracterizando distribuição normal dos resultados (dados não apresentados), possibilitando assim, o uso do método ANOVA.

4.3.1 – Especificidade

A análise da especificidade do ToBI para o componente diftérico foi realizada através da comparação dos valores de absorvância de poços contendo toxina específica (toxina diftérica a 0,125 Lf/mL) com poços contendo a toxina específica (diftérica 0,125 Lf/mL) misturada com toxina inespecífica (tetânica a 0,125 Lf/mL) na proporção de 1:1. A comparação dos resultados não demonstrou diferenças significativas (ANOVA $p>0,05$), indicando que a presença da toxina inespecífica não interfere na neutralização ou detecção da toxina específica presente nas amostras de soro (Tabela 8).

O mesmo esquema experimental foi realizado para avaliar a especificidade do ToBI para o componente tetânico, sendo que nesse ensaio a toxina diftérica (0,125 Lf/mL) foi utilizada como inespecífica. Como demonstrado na tabela 8, a presença da toxina inespecífica (diftérica) não alterou significativamente a detecção do ensaio (ANOVA $p>0,05$).

Tabela 8: Avaliação da especificidade do ToBI para componente diftérico e tetânico*

	Difteria	Tétano
Soro de referência internacional	0,9789	0,9774
Soro de referência nacional	0,9416	0,9638
Soro hiperimune antidiftérico	0,9997	-
Soro hiperimune antitetânico	-	0,9949

*Resultados representam valores de significância de cada amostra utilizando sete diluições em duplicata.

Esses resultados demonstrando a especificidade do ToBI para ambos os componentes, foram confirmados em um segundo experimento, realizado com dois ensaios, onde foram distribuídos dois controles negativos, um com PBS (diluyente) e o outro com toxina inespecífica, além do controle positivo com a toxina específica. Como podemos observar nas tabelas 9 e 10, os valores de absorvância obtidos pelo controle negativo com toxina inespecífica não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos obtidos pelo controle negativo com PBS, ou seja, o controle com a toxina inespecífica não apresenta sinal de ligação com a placa de captura, tal qual o controle PBS, comprovando que este teste é específico para a toxina de interesse (ANOVA $p > 0,05$).

Tabela 9: Valores de absorvância (por poço) do controle negativo utilizando PBS e do controle negativo utilizando toxina inespecífica obtidos no ToBI para o componente diftérico

Média de dois ensaios*	
Controle negativo PBS	Controle negativo toxina tetânica
0,057	0,063
0,058	0,060
0,055	0,060
0,055	0,061
0,056	0,059
0,055	0,061

ANOVA: valor-P 0,816

*Média de dois dias de ensaio. Cada controle foi distribuído em 6 poços.

Tabela 10: Valores de absorbância do controle negativo utilizando PBS e do controle negativo utilizando toxina inespecífica obtidos no ToBI para o componente tetânico

Média de dois ensaios	
Controle negativo PBS	Controle negativo toxina diftérica
0,056	0,070
0,058	0,065
0,061	0,065
0,057	0,064
0,058	0,062
0,057	0,067

ANOVA: valor-P 0,856

*Média de dois dias de ensaio. Cada controle foi distribuído em 6 poços.

4.3.2 – Linearidade

A linearidade do ToBI para cada componente foi determinada utilizando 11 diluições do SRI. O coeficiente de correlação foi obtido através do gráfico do log da diluição pela absorbância. Os resultados apresentaram coeficiente de correlação de $r=0,96$ para o componente diftérico (Figura 9) e $r=0,96$ para o componente tetânico (Figura 10), o que demonstra boa linearidade do método.

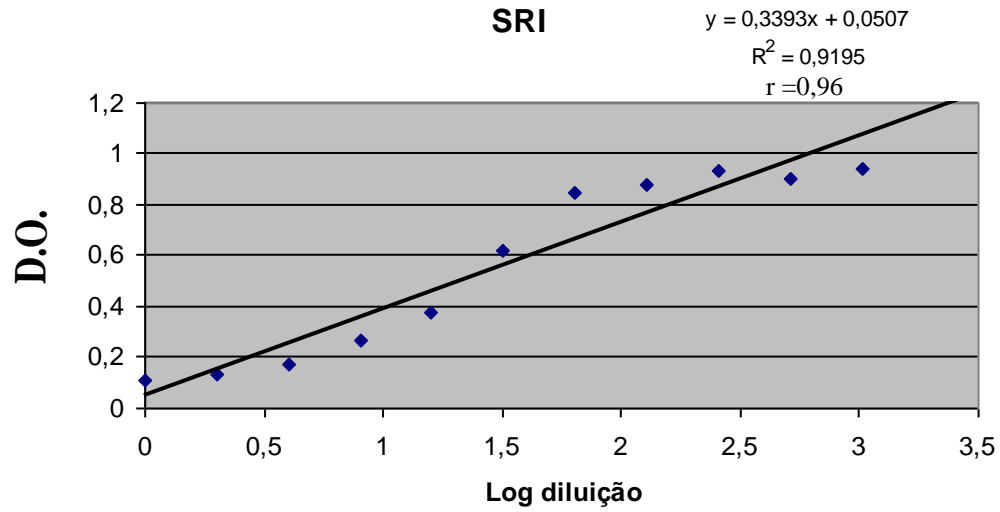


Figura 9: Coeficiente de correlação do SRI para o componente diftérico

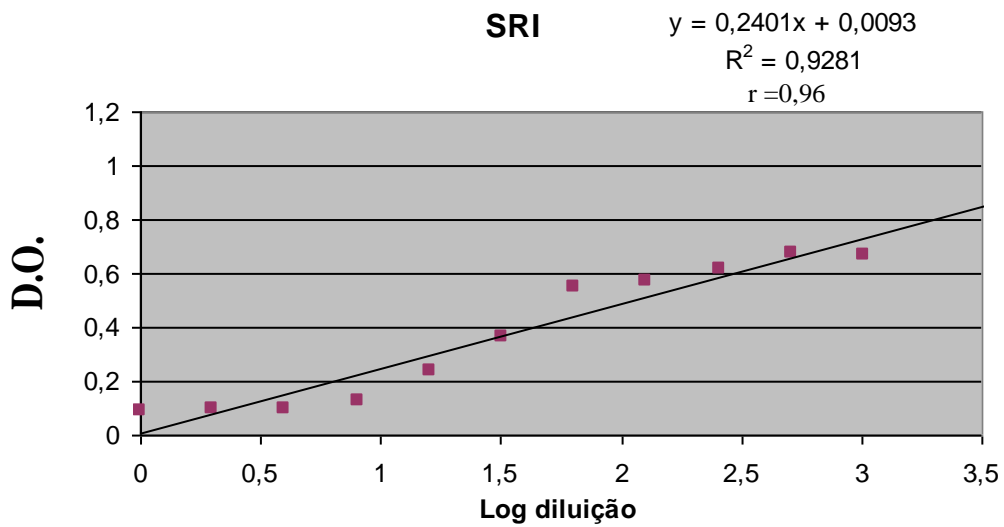


Figura 10: Coeficiente de correlação do SRI para o componente tetânico

5.3.3 – Precisão (intra-ensaio e inter-ensaio)

Para avaliação da repetitividade (precisão intra-ensaio) foram calculados os coeficientes de variação, em percentual (CV%), das absorbâncias obtidas por sete diluições seriadas de 10 diferentes amostras para componente diftérico (Tabela 11) e 10 diferentes amostras para componente tetânico (Tabela 12).

Para avaliar a precisão inter-ensaio, foram calculados os CV% das absorbâncias obtidos a partir das 7 diluições dos soros em duplicata nos 3 distintos dias de experimento (Tabelas 11 e 12). Como é possível observar, os valores de precisão intra-ensaio (CV<10%) e de precisão inter-ensaio (CV<20%) encontram-se abaixo dos limites considerados aceitáveis por agências regulatórias (AOAC, 2000), indicando boa repetitividade do método.

Tabela 11: Avaliação da precisão intra-ensaio (CV% intra) e inter-ensaio (CV% inter) do ToBI para o componente diftérico através dos coeficientes de variação (CV%) entre as absorbâncias obtidas para cada amostra

Amostras	CV% intra			CV% inter
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	
SRI	1,85	4,72	2,10	12,97
SRN	2,82	2,05	2,09	15,47
SH1	1,90	4,50	1,36	14,99
SH2	1,69	4,34	1,85	13,42
SH3	1,93	3,46	0,52	13,97
SH4	1,35	1,62	1,01	11,88
SA1	1,75	2,54	2,55	10,97
SA2	1,99	1,54	1,21	10,65
SA3	2,14	1,55	1,96	17,70
SA4	2,09	2,94	4,68	12,39

SRI: Soro Referência Internacional; SRN: Soro Referência Nacional; SH: Soro Hiperimune; SA: Soro Animal

Tabela 12: Avaliação da precisão intra-ensaio (CV% intra) e inter-ensaio (CV% inter) do ToBI para o componente tetânico através dos coeficientes de variação (CV%) entre as absorbâncias obtidas para cada amostra

Amostras	CV% intra	CV% intra	CV% intra	CV% inter
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	
SRI	8,95	5,82	2,15	8,08
SRN	4,56	1,93	2,20	5,65
SH1	6,67	5,29	2,31	6,67
SH2	7,45	2,39	3,16	7,59
SH3	4,62	5,21	5,56	5,19
SH4	3,59	2,73	5,28	4,76
SA1	3,12	3,06	3,55	12,15
SA2	4,69	5,10	8,65	7,90
SA3	4,13	2,72	5,54	12,14
SA4	3,30	2,93	4,80	10,36

SRI: Soro Referência Internacional; SRN: Soro Referência Nacional; SH: Soro Hiperimune; SA: Soro Animal

Para avaliar melhor a precisão intermediária (inter-ensaio) o CV% foi calculado considerando como variável além do dia (n = 3), o analista do ensaio (n=2). Nas tabelas 13 e 14 encontram-se os valores de CV% para cada produto nos três dias de ensaio dos diferentes analistas. Podemos observar que todos os valores encontram-se abaixo dos limites considerados aceitáveis (AOAC, 2000), dentro de um mesmo dia (CV<10%) e também em diferentes dias ou analistas (CV<20%), o que indica uma boa precisão intermediária do método.

Tabela 13: Avaliação da precisão intra-ensaio (CV% intra) e inter-ensaio (CV% inter) do ToBI para o componente diftérico através dos coeficientes de variação (CV%) entre as absorbâncias obtidas para cada amostra em ensaios realizados por analistas diferentes

Amostras	ANALISTA 1			ANALISTA 2			CV% inter
	CV% intra Dia 1	CV% intra Dia 2	CV% intra Dia 3	CV% intra Dia 4	CV% intra Dia 5	CV% intra Dia 6	
SRI	9,61	1,36	1,18	1,79	4,30	8,22	17,13
SRN	1,50	5,76	2,49	2,29	4,61	1,78	15,18
SH1	2,34	2,72	1,19	2,86	2,83	4,37	16,36
SH2	1,96	1,96	2,36	1,11	1,91	3,56	12,05
SH3	1,98	2,76	0,48	2,13	1,43	3,05	18,44
SH4	1,88	1,94	2,21	2,46	2,34	2,54	18,25
SA1	0,73	2,52	3,35	2,60	2,85	2,61	12,36
SA2	2,12	1,44	4,14	2,52	3,91	1,40	18,89
SA3	1,62	2,13	2,55	2,79	2,45	2,93	15,36

SRI: Soro Referência Internacional; SRN: Soro Referência Nacional; SH: Soro Hiperimune; SA: Soro Animal

Tabela 14: Avaliação da precisão intra-ensaio (CV% intra) e inter-ensaio (CV% inter) do ToBI para o componente tetânico através dos coeficientes de variação (CV%) das absorbâncias obtidos em ensaios realizados por analistas diferentes

Amostras	ANALISTA 1			ANALISTA 2			CV% inter
	CV% intra Dia 1	CV% intra Dia 2	CV% intra Dia 3	CV% intra Dia 4	CV% intra Dia 5	CV% intra Dia 6	
SRI	5,64	3,09	3,49	5,66	0,43	2,47	10,53
SRN	2,27	4,65	2,94	4,13	1,03	0,80	18,77
SH1	3,60	2,77	2,24	2,47	2,22	2,97	7,21
SH2	3,35	3,85	4,26	1,99	1,37	3,17	17,13
SH3	2,83	1,20	5,97	2,07	1,20	2,65	18,25
SH4	2,70	3,14	0,99	1,10	1,54	1,83	17,13
SA1	2,16	1,53	1,22	1,22	1,69	2,16	10,43
SA2	4,73	2,99	1,74	2,99	1,74	2,05	3,85

SRI: Soro Referência Internacional; SRN: Soro Referência Nacional; SH: Soro Hiperimune; SA: Soro Animal

Para confirmar a precisão intermediária, além de calcular coeficiente de variação dos resultados dos diferentes analistas, também foi realizada a análise de variância (ANOVA). Como podemos observar nas tabelas 15 e 16 (componente diftérico e tetânico, respectivamente) os resultados não diferiram, comprovando que não existe diferença entre analistas (ANOVA $p > 0,05$).

Tabela 15: Análise de variância (ANOVA) do ToBI para componente diftérico de ensaios realizados por analistas diferentes

AMOSTRAS	valor-P
SRI	0,99974
SRN	0,99998
SH1	0,99988
SH2	0,97796
SH3	0,98809
SH4	0,99327
SA1	0,98736
SA2	0,88505
SA3	0,99698

SRI: Soro Referência Internacional; SRN: Soro Referência Nacional; SH: Soro Hiperimune; SA: Soro Animal

Tabela 16: Análise de variância (ANOVA) do ToBI para componente tetânico de ensaios realizados por analistas diferentes

AMOSTRAS	valor-P
SRI	0,99999
SRN	0,99998
SH1	1,00000
SH2	1,00000
SH3	0,99999
SH4	0,99999
SA1	0,96064
SA2	0,99999

SRI: Soro Referência Internacional; SRN: Soro Referência Nacional; SH: Soro Hiperimune; SA: Soro Animal

5.3.4 – Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Conforme mencionado anteriormente, os limites de detecção foram calculados a partir das médias das absorvâncias do branco em 30 ensaios e a elas foram somados três desvios padrão (DP). Em paralelo, os limites de quantificação foram calculados através da média da absorvância do branco de 30 ensaios somando 10 DP. A tabela 17 apresenta os limites de detecção e de quantificação expresso em absorvância para cada componente.

Tabela 17: Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

	Componente diftérico	Componente tetânico
LD	0,076	0,082
LQ	0,121	0,130

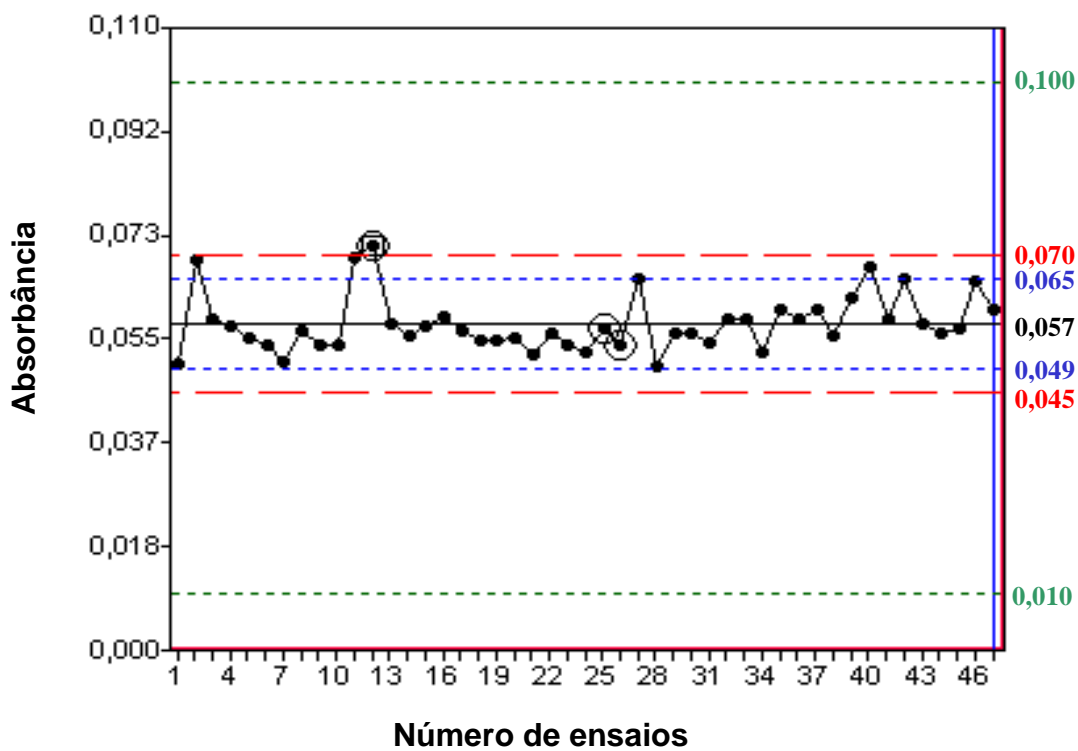
5.4 – Determinação dos Limites de Confiança

Os limites de confiança foram determinados através dos gráficos de controle em que os limites de desvios foram calculados a partir dos 20 primeiros valores de absorvância em ensaios contendo um controle positivo (toxina específica) e um controle negativo (PBS) de cada componente (diftérico e tetânico).

As figuras 11 e 12 mostram, respectivamente, os gráficos com os valores do controle negativo e positivo obtidos no ToBI para o componente diftérico. Os ensaios para difteria considerados válidos possuem valores de absorvância dentro dos limites preconizados pela OMS (WHO, 1997), identificados no gráfico pela linha verde, para o controle negativo (0,010 e 0,100) e positivo (0,6 e 1,5).

Entretanto, observa-se que quatro ensaios foram considerados inválidos (um para o controle negativo e três para o positivo) por encontrarem-se fora dos limites de três desvios-padrão (DP). Os ensaios inválidos estão destacados no gráfico por um quadrado dentro de um círculo. Estes ensaios inválidos, que representam aproximadamente 11% do total, não foram utilizados para avaliação dos parâmetros de validação.

No gráfico da figura 11, dois resultados foram marcados por um círculo, o que demonstra que esses valores sinalizam um erro sistemático nos testes de performance realizados pelo Software, que nesse caso, a ocorrência de nove valores consecutivos no mesmo lado da média. Esses ensaios (de número 25 e 26) não foram invalidados, mas a partir deles, aumentou-se a vigilância no processo. Na figura 12, alguns valores estão envoltos por um círculo, que se encaixam no requisito “nove valores consecutivos no mesmo lado da média”, entretanto, dois outros também estão envoltos por um círculo (ensaios de número 16 e 22) e indicam um outro critério “dois valores consecutivos além dos limites de alerta superior ou inferior (2DP)”. Quatro resultados do controle positivo (figura 12) foram consideradas inválidos, pois apresentam-se abaixo do limite de controle (3DP). Esses resultados também se mostram fora dos limites preconizados pela OMS, sinalizado pela linha verde. Esses dados demonstram a importância do acompanhamento através dos gráficos de controle, pois identifica a necessidade de aumento da vigilância de modo a minimizar causas especiais de variação no processo.



- Limites preconizados OMS
- Limites de controle 3 desvios-padrão
- Limites de alerta 2 desvios-padrão
- Média

Figura 11: Limites de confiança dos valores de absorbância obtidos pelo controle negativo utilizado no ToBI para determinação de potência do componente diftérico.

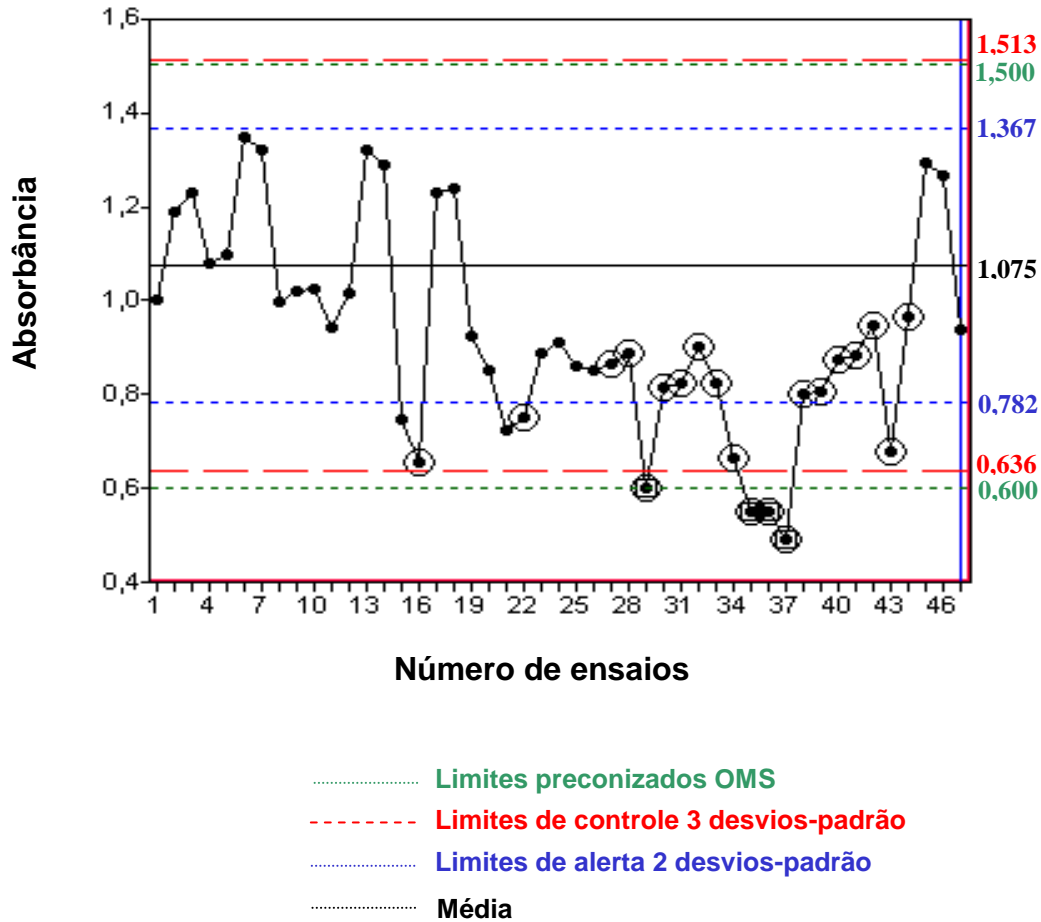


Figura 12: Limites de confiança dos valores de absorvância obtidos pelo controle positivo utilizado no ToBI para determinação de potência do componente diftérico

As figuras 13 e 14 mostram, respectivamente, os gráficos com os valores de absorvância do controle negativo e positivo obtidos nos ensaios com o componente tetânico. Nos ensaios para tétano não foram encontrados valores fora dos limites preconizados pela OMS para os controles negativo e positivo. No gráfico da figura 13 não foi sinalizado nenhum ensaio fora dos limites de controle (3DP) ou limites de alerta (2DP).

O gráfico do controle positivo (figura 14) aponta um ensaio (17) sinalizado pelo critério “dois valores consecutivos além dos limites de alerta superior (2 DP)”, dois ensaios

(33 e 34) pelo critério “nove valores consecutivos no mesmo lado da média” e três outros com resultado inválido por apresentar valores fora dos limites de três desvios-padrão (DP).

Da mesma maneira que para os ensaios para difteria, os ensaios inválidos não foram utilizados no processo de validação do componente tetânico e após a observação desses alertas, procedeu-se ao aumento da vigilância no ensaio para o componente tetânico.

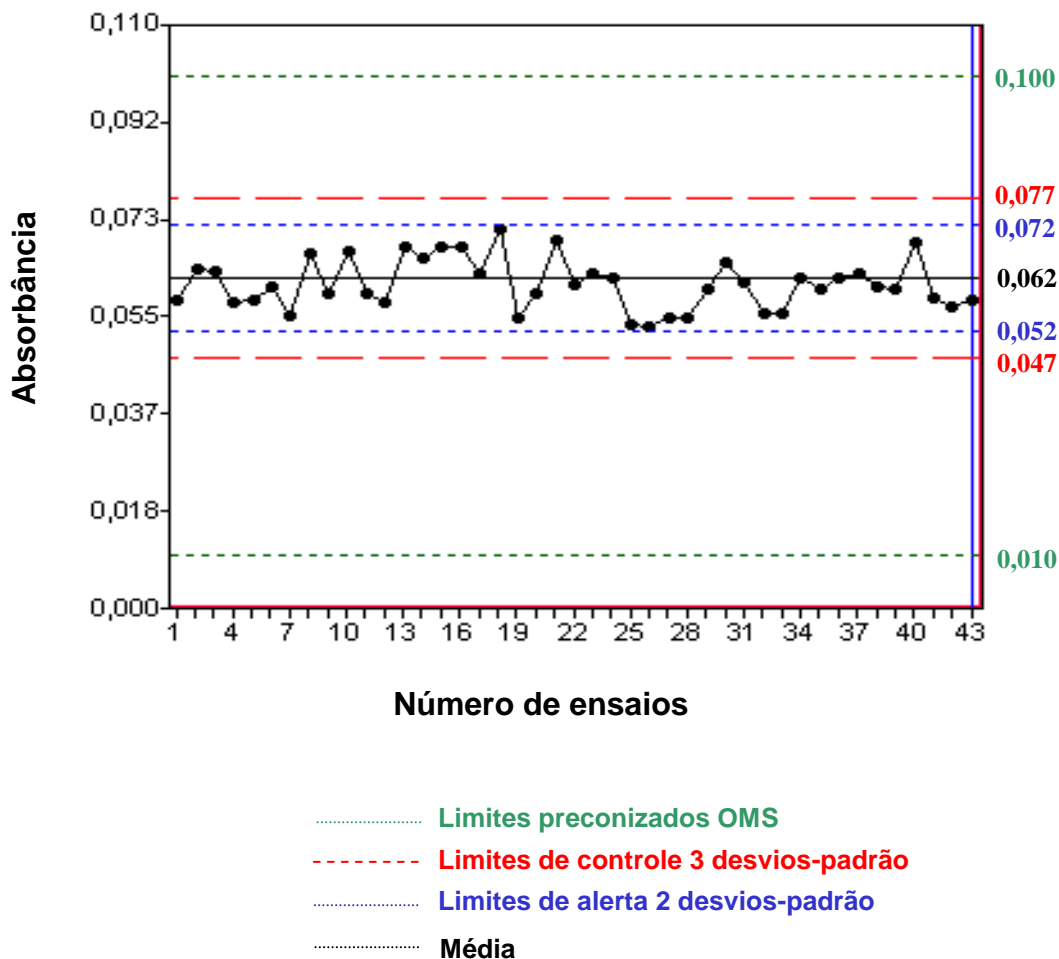


Figura 13: Limites de confiança dos valores de absorvância obtidos pelo controle negativo utilizado no ToBI para determinação de potência do componente tetânico

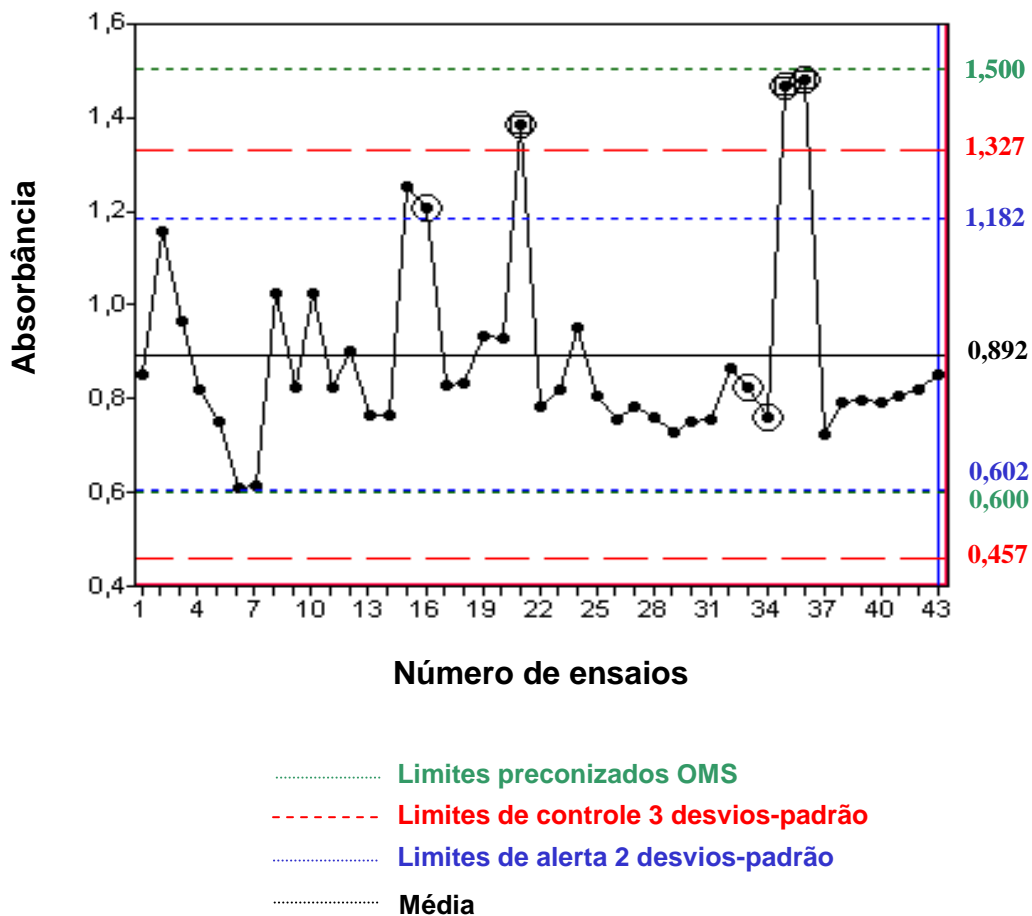


Figura 14: Limites de confiança dos valores de absorvância obtidos pelo controle positivo utilizado no ToBI para determinação de potência do componente tetânico.

5.5 – Avaliação da possível interferência de componentes do soro de animais

Para estabelecer o valor de potência de vacinas, grupos de animais são imunizados e após o período de imunização são sangrados e o soro é separado para titulação de anticorpos.

A avaliação de um possível interferente foi realizada através de comparação do controle positivo contendo toxina diftérica diluída em PBS com o controle positivo contendo toxina diftérica diluída em soro de animal não imunizado. O mesmo foi realizado para o componente tetânico. Foram realizados quatro ensaios em diferentes dias com

diluição de 1:2 para o soro animal oito diluições seriadas das toxinas com fator de diluição de 1,2 partindo da concentração de 0,20 LF/mL. Também foi estabelecida comparação entre controle negativo contendo somente PBS com o controle negativo contendo somente soro animal não imunizado. A comparação dos resultados não demonstrou diferenças significativas conforme demonstrado na tabela 18 (ANOVA $p>0,05$), indicando que a presença de outros componentes no soro animal não interfere no resultado do ensaio *in vitro*.

Tabela 18: Comparação dos controles diluídos em PBS com os controles diluídos em soro animal não imunizado.

CONTROLES	valor-P
Positivo diftérico	0,95
Positivo tetânico	0,96
Negativo	0,72

ANOVA entre quatro ensaios em diferentes dias

5.6 – Comparação dos resultados do soro obtido após 4 e 6 semanas de imunização no ToBI para o componente tetânico

Na quarta e na sexta semana após a imunização os animais foram sangrados e o título de antitoxina tetânica foi avaliado pelo ToBI. Foram realizados 3 ensaios em duplicata em diferentes dias, utilizando 7 diluições por amostra. Os resultados de cada amostra foram comparados através da análise de variância demonstrada na tabela 19 (ANOVA $p>0,05$).

Tabela 19: ANOVA entre ToBI utilizando primeira e segunda sangria para componente tetânico

AMOSTRAS	valor-P
SA1 (1° e 2° sangria)	0,95
SA2 (1° e 2° sangria)	0,90
SA3 (1° e 2° sangria)	0,85
SA4 (1° e 2° sangria)	1,00
SA5 (1° e 2° sangria)	0,86

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados utilizando soro animal de primeira sangria quando comparados com os resultados de soro animal de segunda sangria para determinação de antitoxina tetânica pelo ToBI, comprovando a possibilidade de única sangria.

5.7 – Correlação entre os resultados *in vivo* do laboratório produtor e do ToBI (*in vitro*)

Os valores de potência utilizados na confecção dos gráficos são derivados da média aritmética dos seis ensaios apresentados na tabela 20 para o componente diftérico e na tabela 21 para o componente tetânico. Os resultados apresentaram coeficiente de correlação de $r=0,97$ com valor de $p =0,005$ para vacinas diftéricas (Figura 15) e $r=0,97$ com valor de $p <0,005$ para amostras de tétano (Figura 16), o que demonstra boa correlação entre os resultados.

Tabela 20: Valor de potência estimado pelo ensaio ToBI para componente diftérico

Amostras	Valor potência* (UI)
SRN	11,0
SA1	2,8
SA2	2,7
SA3	2,8
SA4	2,6

SRN: Soro Referência Nacional; SA: Soro Animal

*Média entre seis ensaios

Tabela 21: Valor de potência estimado pelo ensaio ToBI para componente tetânico

Amostras	Valor potência* (UI)
SRN	10,00
SA1	4,60
SA2	2,88
SA3	8,9
SA4	10,2
SH1	5,6
SH2	3,7
SH3	3,6
SH4	3,9

SRN: Soro Referência Nacional; SA: Soro Animal; SH: Soro Hiperimune

*Média entre seis ensaios

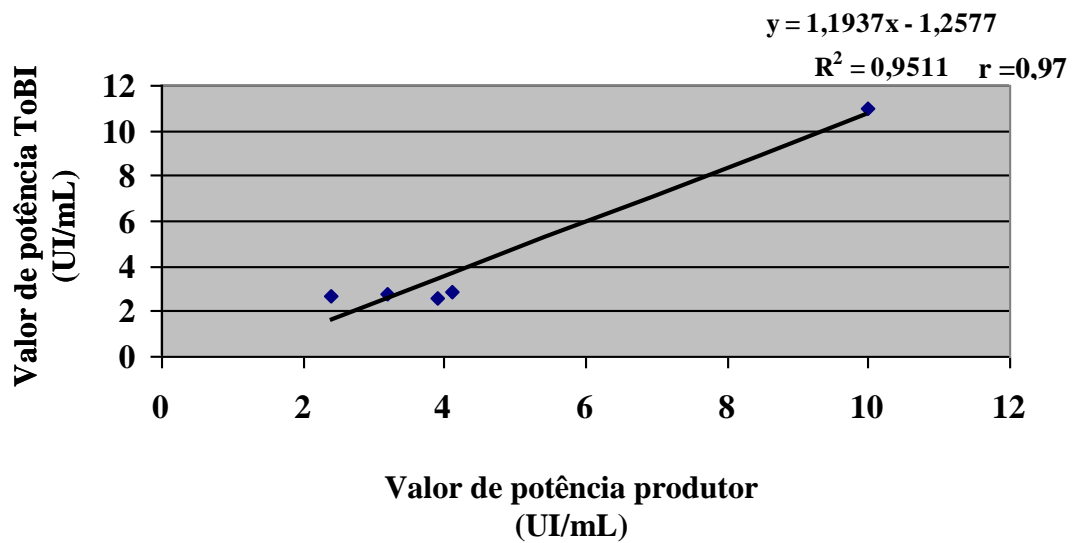


Figura 15: Correlação dos resultados de potência obtidos no ensaio *in vivo* (laboratório produtor) e pelo ToBI (*in vitro*) do componente diftérico

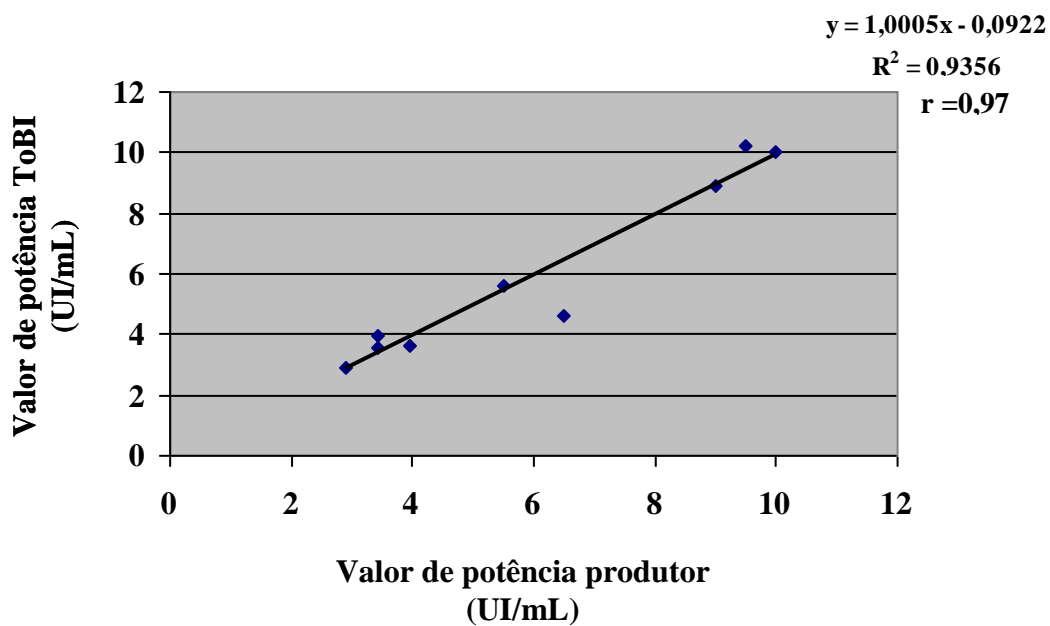


Figura 16: Correlação dos resultados de potência obtidos no ensaio *in vivo* (laboratório produtor) e pelo ToBI (*in vitro*) do componente tetânico

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foram realizadas algumas etapas de validação do teste ToBI, desenvolvido com a finalidade de reduzir ou substituir os animais no controle de potência de vacinas de difteria e tétano e soros hiperimunes.

Previamente à validação do ToBI, foi necessária uma etapa de titulação de alguns reagentes (soro de captura, toxina e anticorpo conjugado à peroxidase) através de um ensaio imunoenzimático simples de detecção da toxina. Essa titulação permitiu a determinação das concentrações mais adequadas de reagentes para que o ensaio obtivesse valores de absorvância ideais. A concentração do soro de captura que melhor se ajustou ao ensaio foi a de 20 µg/mL, para ambos os componentes (dados não apresentados). Utilizando essa concentração de soro de captura, foram realizadas as titulações das toxinas e dos anticorpos conjugados.

A titulação das toxinas foi realizada nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 Lf/mL. Como não houve diferença significativa dos valores de absorvância entre as concentrações testadas, a menor (0,125 Lf/mL) foi selecionada. Alguns testes sorológicos para determinação de potência de vacinas contra difteria e tétano já demonstraram resultados dependentes da quantidade de toxina utilizada no ensaio, onde concentrações elevadas poderiam aumentar o título do soro analisado (GUPTA et al., 1994). Dessa maneira, Vandenberg e colaboradores (1999) realizaram um experimento para comparar a interferência de diferentes concentrações de toxina sobre os valores de potência obtidos por diferentes metodologias: o teste com células Vero, o ELISA e o ToBI. Esses experimentos demonstraram que o ToBI foi o único teste onde a concentração de toxina não interferiu com o título de anticorpo (VANDENBERG et al., 1999).

As diluições dos anticorpos antitoxina conjugados à peroxidase consideradas ideais foram as que obtiveram valores de absorvância próximos a 1,0 na etapa de titulação que foram as diluições de 1:8000 para o componente diftérico e de 1:4000 para o tetânico.

As concentrações de toxinas (0,125 Lf/mL) e de anticorpos conjugados (1: 8000 para o antidiftérico e 1:4000 para antitetânico) consideradas adequadas na titulação foram

utilizadas na validação do ToBI. Entretanto, ao realizarmos o teste ToBI, os valores de densidade óptica (DO) diminuíram cerca de 50% em relação aos encontrados durante a titulação, para ambos os componentes. Por isso, foi necessária uma nova titulação dos anticorpos conjugados, dessa vez no teste ToBI propriamente dito. Nessa condição, os valores considerados adequados para o anticorpo conjugado antidiftérico passou a ser de 1:4000 e para o antitetânico de 1:2000. Essa diminuição dos valores de DO pode ser explicada pelo fato da titulação ter sido realizada em um único dia, quando uma placa sensibilizada com soro de captura recebeu diferentes concentrações de toxina, o anticorpo conjugado e o substrato em seguida. Já no ToBI existe uma etapa adicional de soroneutralização onde a mistura de amostra e toxina é incubada por 18 horas antes do início do teste. Provavelmente essa diferença dos valores de DO obtidos nas etapas de titulação e do ToBI ocorreu devido à realização da soroneutralização que não foi realizada durante a titulação.

A partir dessas observações, pode-se estimar que a titulação deve ser realizada simulando todas as etapas do ToBI, incluindo a etapa prévia de soroneutralização. Alguns autores utilizam concentrações de toxina e de conjugado no ToBI bastante distintas das encontradas durante a titulação de nossos reagentes. Essas diferenças nas concentrações utilizadas estão listadas na tabela 22 e podem ocorrer devido a diversos fatores como procedência e lote dos reagentes, equipamentos e analista envolvidos. O nosso estudo teve como base as informações contidas nos estudos da literatura para iniciar a padronização do ToBI. Todavia muitas das concentrações de reagentes e condições de ensaio propostas por esses estudos não se mostraram adequadas às condições do nosso laboratório.

Nesse contexto o estudo estabelece um protocolo para ser utilizado em um estudo colaborativo a ser realizado em conjunto com os laboratórios produtores como uma próxima etapa na validação do método (reprodutibilidade).

Tabela 22: Comparação das concentrações dos reagentes utilizados e das características das diferentes etapas do ToBI encontrados na literatura.

Referência (componente analisado)	Diluições do soro de referência	Concentração toxina	Tempo e temperatura de incubação SN	Concentração soro captura	Concentração do anticorpo conjugado e temperatura de incubação
Farmacopéia Européia (tétano)	Não especifica	0,04 Lf (tétano)	37°C mínimo 12 horas	Não especifica	1:4000 (tétano) 37°C
WHO, 1997 (tétano)	Parte de 50UI	0,04 Lf	37°C mínimo 12 horas	1 UI/ml	1:4000 temperatura ambiente
Hendriksen et al. 1988 (tétano); 1989 (difteria)	1UI até 0,0039UI	0,008 Lf (difteria) 0,01 Lf (tétano)	37°C mínimo 12 horas	1 UI/ml	1:2000 (difteria) 1:5000 (tétano) temperatura ambiente
Marcovistz et al., 2002 (difteria)	5UI até 0,156UI	1 Lf	90 min. 37°C e 4°C mínimo 12 horas	20µg/ml	1:2000 (difteria) temperatura ambiente
Matos et al., 2002 (tétano)	10UI até 0,156UI	1 Lf	90 min. 37°C e 4°C mínimo 12 horas	20µg/ml	1:2000 (tétano) temperatura ambiente
Protocolo Butantan (difteria e tétano)	5UI até 0,04UI	0,5 Lf	90 min. 37°C e 4°C mínimo 12 horas	20µg/ml	1:1000 temperatura ambiente
INCQS (difteria e tétano)	1,25UI até 0,02UI	0,125 Lf/mL (dif) 0,125 Lf/mL (tét)	90 min. 37°C e 4°C mínimo 12 horas	20µg/ml	1:2000 (tétano) 1:4000 (difteria) temperatura ambiente

SN – soroneutralização

Além de fatores como procedência e lote dos reagentes, que podem impactar nos resultados, existem variações inerentes aos testes biológicos *in vivo* ou *in vitro*, que devem ser bem analisadas e controladas de modo a garantir a qualidade dos resultados obtidos. A utilização de materiais de referência certificados e com potência aferida é uma importante ferramenta que assegura a qualidade dos testes biológicos. Além disso, o acompanhamento adequado do material de referência pode alertar para variações anormais no processo. No contexto dos testes utilizados para liberação de lotes de produtos para uso humano, esse controle do processo é ainda mais necessário, uma vez que pode impactar importantes políticas de saúde pública, como a vacinação.

A OMS recomenda o uso de gráficos de controle dos materiais de referência para análise de tendências dos resultados e variações no processo de produção (WHO, 1997; 2009). As variações podem ocorrer por alteração da atividade do material de referência, mas também do próprio método ou de outros fatores envolvidos, como linhagens celulares, animais, reagentes e técnicos (WHO, 2009). Os gráficos de controle determinam limites de controle, como os intervalos de confiança de 2 (2DP) e 3 desvios-padrão (3DP) e permitem a realização de testes de performance (WHO, 1997; 2009). Dependendo do resultado, é recomendado o aumento da supervisão ou a invalidação do ensaio.

Durante a padronização do ToBI, a confecção de gráficos de controle permitiu monitorar os controles negativo (PBS) e positivo (toxina específica). Dessa maneira foi possível prevenir que ensaios com valores de absorbância fora dos limites fossem considerados válidos e utilizados indevidamente para cálculo de potência. Por isso, esses resultados não foram usados no processo de validação. Nos gráficos confeccionados para o componente diftérico, cinco ensaios foram considerados inválidos, pois em um ensaio o controle negativo encontrava-se fora dos limites de controle (3DP) e em outros quatro ensaios, o controle positivo. No gráfico do controle positivo de difteria foi possível observar que a partir do ensaio de número 19 houve uma tendência de diminuição dos valores de absorbância, alertando para a necessidade de supervisão e análise crítica do processo, evitando uma futura invalidação de ensaios. Já para o componente tetânico, três ensaios foram considerados inválidos, pois os valores do controle positivo encontravam-se acima dos limites de controle. As principais causas especiais de variação para os dois componentes foram os reagentes e soluções utilizados. Em diversos momentos desse estudo

foi possível identificar que o TMB, o peróxido de hidrogênio e o tampão acetato devem encontrar-se exatamente nas concentrações e/ou valor de pH especificados no protocolo.

5.1 Validação do ToBI

A validação é uma etapa necessária para a aceitação do ToBI nos testes de rotina para avaliação de potência dos componentes diftérico e tetânico. O termo validação vem do latim *valere* que significa “ter força”. Para um método “ter força” o estudo deve avaliar a confiabilidade e a relevância do novo método (BALLS et al., 1990).

A confiabilidade do ToBI como teste para avaliação de potência foi determinada a partir da avaliação dos parâmetros de validação preconizados na RE 899 da ANVISA de 2003. Já a sua relevância fundamenta-se em sua capacidade de determinar a potência de vacinas e soros hiperimunes e distinguir títulos altos e baixos (HENDRIKSEN et al., 1991).

A especificidade do ToBI para os componentes diftérico e tetânico foi determinada verificando se havia interferência de uma toxina inespecífica com o anticorpo conjugado e/ou com o soro de captura. Essa verificação foi realizada comparando os valores de absorbância dos poços com toxina inespecífica e com PBS (controle negativo). Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$ ANOVA) dos valores de DO obtidos nos poços com PBS ou com a toxina inespecífica, comprovando que não ocorreu ligação inespecífica com o conjugado ou o soro de captura.

Para avaliar a linearidade, foram realizados ensaios para os componentes diftérico e tetânico utilizando soro de referência internacional (SRI). No ToBI a absorbância é inversamente proporcional a concentração de anticorpos presentes nos soros, ou seja, aumentando a diluição a absorbância aumenta proporcionalmente. Isso ocorre porque a medida que se dilui mais o soro, a neutralização da toxina se torna incompleta e é caracterizada pelo aumento da absorbância (DO). Por outro lado, a completa inibição da ligação da toxina resulta em valores baixos de DO, semelhantes ao controle negativo. Conseqüentemente, uma amostra de soro que tenha maior potência apresentará valores de absorbância mais baixos do que aqueles que tenham potência menor. Para os dois componentes, a linearidade só pode ser analisada em uma determinada faixa de diluição, pois em concentrações mais altas o soro neutraliza praticamente toda a toxina presente na

mistura, apresentando valores abaixo do limite de detecção. Entretanto, em concentrações mais baixas, o soro quase não é capaz de neutralizar toxina, resultando em valores próximos ao controle positivo (toxina específica).

A avaliação da repetitividade foi realizada a partir de cálculo de coeficiente de variação, em percentual (CV%), das absorbâncias para cada componente. Durante a avaliação da precisão intra (repetitividade) e inter-ensaio (intermediária) do ToBI observamos que os coeficientes de variação (CV) encontravam-se dentro dos critérios das normas oficiais (US FDA-CBER, 1997; AOAC, 2000). Os valores de repetitividade estavam abaixo de 10% (CV<10%) e os valores de precisão intermediária abaixo de 20%.

Para avaliar melhor a precisão intermediária (inter-ensaio), o CV% foi calculado considerando como variável além do dia (n = 3), o analista do ensaio (n=2). Os valores de precisão intermediária encontram-se também abaixo dos limites preconizados, quando os ensaios eram realizados em diferentes dias ou analistas (US FDA-CBER, 1997; AOAC, 2000). Esses achados demonstram que não existem variações significativas dos resultados quando os testes são realizados no mesmo dia ou em dias diferentes e por analistas diferentes.

Os limites de detecção obtidos para os componentes diftérico e tetânico demonstram que valores de absorbância abaixo de 0,076 e 0,082, respectivamente, não podem ser diferenciados do controle negativo. Já os limites de quantificação de 0,121 para difteria e de 0,130 para tétano mostram que somente valores maiores ou iguais a esses podem ser quantificados com confiabilidade.

Como a determinação de potência das vacinas é realizada em amostras de soro de cobaias imunizadas, foi avaliada a possível interferência de componentes do soro de cobaias no ensaio. Para isso, foram comparados os valores de absorbância de dois controles positivos para cada componente, de modo que em um controle a toxina específica foi diluída em PBS e no outro controle positivo a toxina foi diluída em soro de animal não imunizado. Também foi comparada a absorbância de dois controles negativos, um com PBS puro e o outro com soro de animal não imunizado. Os valores de DO obtidos do controle negativo com o soro de cobaias não imunizadas foram semelhantes aos obtidos com o controle negativo de PBS. Da mesma maneira, o controle positivo com a toxina específica diluída em soro de cobaia não imunizada, apresentaram valores de DO

semelhante ao controle positivo com toxina específica diluída em PBS. Esses resultados comprovam que não houve redução do sinal através de ligações dos componentes do soro de animais não imunizados com a toxina específica na fase de soroneutralização e nem potencialização do sinal com possíveis ligações inespecíficas do soro de animais não imunizados na segunda placa sensibilizada com soro de captura antitoxina. Este experimento demonstra a capacidade do ToBI em detectar somente ligações específicas entre antitoxina/toxina e que outros componentes do soro animal não interferem no ensaio, indicando que o ToBI, pode ser aplicável tanto no controle de soro hiperimune purificado quanto soro de cobaias imunizadas com vacinas de difteria e tétano.

Outro fato importante na validação do teste é a comparação dos resultados de potência do ToBI com o teste farmacopéico *in vivo*. Entretanto, foram observadas algumas diferenças nas metodologias de cálculo preconizadas ou utilizadas por diferentes fontes (Tabela 23). Algumas das fontes consultadas (HENDRIKSEN et al., 1988; 1989b; WHO, 1997; MARCOVISTZ et al., 2002; MATOS et al., 2002) primeiramente calculam a DO₅₀ e, em seguida, calculam a potência através da análise por linhas paralelas. Entretanto, o próprio cálculo da DO₅₀ varia entre os autores consultados (Tabela 23).

Segundo Hendriksen e colaboradores o título de um soro desconhecido é determinado pelo estabelecimento da diluição I+ de ambos soros (referência e teste). A diluição I+ é definida como a menor diluição de antitoxina que, ao ser misturada com 0,01 Lf/ml de toxina, inibe incompletamente a ligação de toxina na placa sensibilizada com antitoxina específica (HENDRIKSEN et al. 1988; 1989b). Essa incompleta inibição é expressa pelo aumento da densidade óptica. Desse modo, a potência relativa pode ser calculada pela comparação da diluição I+ do soro em teste com a diluição I+ do soro de referência.

Diferentemente de Hendriksen, o manual da OMS (WHO, 1997) calcula a DO₅₀ de cada placa aplicando a seguinte fórmula: (média da absorbância do controle positivo + a média da absorbância do controle negativo)/2. Posteriormente determina o escore para cada amostra de soro, que representa a diluição referente ao último poço com um valor de absorbância abaixo da DO₅₀. Em seguida, a potência é determinada pelo cálculo de linhas paralelas (WHO, 1997).

Já a Farmacopéia Européia é sucinta com relação ao cálculo de potência pelo ToBI, informando apenas que a comparação deve ser realizada por análise de linhas paralelas, não citando nada sobre como interpretar os dados nem valores de potência mínimos preconizados para cada produto (FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2008).

Tabela 23: Variação de cálculo de potência para o ensaio ToBI entre diferentes autores

Referência	Cálculo de potência
HENDRIKSEN et al. 1988 (tétano)	Cálculo da potência relativa através da determinação da I+ (menor diluição de antitoxina que, ao ser misturada com 0,01 Lf/ml de toxina inibe incompletamente a ligação de toxina)
HENDRIKSEN et al. 1989b (difteria)	Determinação da I+ como em Hendriksen et al. 1988 OU DO ₅₀ : Diferença entre média da DO do controle positivo pela média da DO do controle negativo dividido por 2
WHO, 1997 (tétano e difteria)	Cálculo da DO ₅₀ : média da absorbância do controle positivo + a média da absorbância do controle negativo)/2.
MARCOVISTZ et al., 2002 (difteria); MATOS et al., 2002 (tétano)	Cálculo da DO ₅₀ : Metade da média da DO do controle positivo
FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2008 (tétano)	Análise de linhas paralelas
INCQS (difteria e tétano)	Análise de linhas paralelas (Combstat®)

DO – densidade óptica; DO₅₀ – densidade óptica média.

Em nosso estudo seguimos a Farmacopéia Européia que preconiza o cálculo de potência pelo método de análise por linhas paralelas utilizando o programa Combstat®. Além disso foi realizada a comparação dos resultados de potência obtidos no ToBI com os fornecidos pelos produtores dos soros e vacinas, determinados através do ensaio *in vivo* de soroneutralização, através do coeficiente de correlação de Pearson.

A correlação foi estabelecida a partir dos valores de potência do produtor e a média aritmética dos valores de potência entre diferentes dias de ensaio *in vitro* (n=6) para cada amostra.

Foram calculados os valores de potência de quatro amostras de vacina diftérica e nove amostras para componentes tetânicos (cinco vacinas e quatro soros hiperimunes). Os resultados apontaram boa correlação tanto para amostras de difteria ($r= 0,97$) quanto para tétano ($r= 0,97$). Esses dados sugerem que o ensaio ToBI possui uma boa correlação com o modelo oficial de teste para determinação de potência, uma vez que o produtor libera laudos através de ensaios *in vivo*. Cabe lembrar que para realizar a correlação do componente diftérico somente foi possível utilizar amostras de quatro vacinas diftéricas, uma vez que os soros analisados possuíam valores imprecisos de potência, especificados pelo produtor apenas como maior que 1200 UI/mL, impedindo o estabelecimento de coeficiente de correlação de Pearson.

Os produtos analisados nesse estudo possuem os seguintes critérios de aprovação segundo a Farmacopéia Brasileira: a) mínimo de 2 UI/mL dos componentes diftérico e tetânico para as vacinas de uso infantil (DT, DTP, DTP Hib etc); b) mínimo de 0,5 UI/mL do componente diftérico e no mínimo 2 UI/mL do componente tetânico para a vacina de uso adulto (dT); c) mínimo 1000 UI/mL para os soros hiperimunes antitetânico e antidiftérico (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2004). Todos os produtos analisados foram aprovados pelo INCQS através do método de soroneutralização.

A etapa de validação foi realizada através de diversos parâmetros com exceção do estudo inter-laboratorial. Essa última etapa só é possível quando todos os outros parâmetros de validação são atendidos, como apresentado no presente estudo. Entretanto, a maior dificuldade de realização de estudo inter-laboratorial é a seleção de laboratórios participantes interessados no estudo, principalmente porque no Brasil só existem dois

laboratórios produtores de vacina para difteria e tétano que poderiam participar de um estudo colaborativo.

Com a validação do ensaio ToBI torna-se possível a substituição da etapa de soroneutralização *in vivo* no controle da potência de componentes diftéricos e tetânicos presentes em soros e vacinas, mas além da substituição este estudo também propõe um possível refinamento do ensaio tradicional. A Farmacopéia Brasileira preconiza a utilização de soro animal obtido 4 semanas (primeira sangria) após a imunização para o componente diftérico e 6 semanas (segunda sangria) após imunização para componente tetânico (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2004). Dessa maneira é necessário que os animais permaneçam mais duas semanas até que outra punção seja realizada.

Para diminuir o tempo de duração do ensaio e a permanência e sofrimento das cobaias, foi realizado um experimento que avaliou a possibilidade de utilizar o soro da primeira sangria (4 semanas) para determinar a potência também do componente tetânico no teste ToBI. Não foram encontradas diferenças significativas quando os resultados dos ensaios que utilizaram soro animal da primeira sangria foram comparados com os resultados com soro animal da segunda sangria. Dessa maneira, foi possível propor uma única sangria a ser realizada para determinar a potência *in vivo* e *in vitro* dos componentes diftérico e tetânico. Essa constatação representa um refinamento do ensaio não só pelo fato de evitar o sofrimento prolongado dos animais ao eliminar a segunda punção cardíaca, mas também por representar a redução de tempo em até duas semanas na liberação de lotes de vacinas em análise, assim como a redução no custo da manutenção dos animais por mais duas semanas.

5.2 Relevância do ToBI para o controle de potência de soros e vacinas

A grande vantagem e explicação para a correlação do ToBI com resultados *in vivo* reside no fato dele mimetizar a neutralização da toxina por anticorpos produzidos durante a imunização e impedindo sua ligação com as células alvo (HENDRIKSEN et al., 1989b). O ToBI foi desenvolvido baseado nos efeitos farmacocinéticos das toxinas liberados pelos patógenos causadores da difteria e do tétano no organismo hospedeiro. Sabe-se que a toxina tetânica produz seus efeitos deletérios devido a sua ligação a componentes da membrana neuronal e a toxina diftérica a receptores de superfície celular (ZIMMERMAN & PIFFARETTI, 1977 *apud* HENDRIKSEN et al., 1988).

Produtos biológicos, tais como soros hiperimunes e vacinas, podem, resumidamente ser definidos como derivados ou produzidos por organismos vivos. Isso implica que suas características podem variar de um lote para outro. Conseqüentemente um minucioso controle de qualidade na liberação de lotes é requerido para garantir que esses produtos sejam seguros e eficazes (HENDRIKSEN, 2002).

Estima-se que no mundo, mais de 10 milhões de animais sejam utilizados anualmente no desenvolvimento, produção e controle da qualidade somente para imunobiológicos. Estes animais são utilizados em testes que podem ser divididos em duas categorias, os testes de segurança e os de potência para o controle da qualidade e conseqüentemente liberação dos lotes. Cerca de 80% destes animais são utilizados em testes rotineiros de controle da qualidade para liberação de lotes (HENDRIKSEN, 2002).

Somente para realização do ensaio de potência para o produto final de vacinas e soros antidiftéricos e antitetânicos, são utilizados no INCQS cerca de 5.000 animais por ano, desses aproximadamente 4.500 animais são utilizados na etapa de soroneutralização e o restante na etapa de imunização.

Além de necessitar de um grande número de animais, o teste *in vivo* oferece outras desvantagens como grandes variações nos resultados entre laboratórios, muito provavelmente devido a diferenças genéticas dos animais utilizados (METZ et al., 2002).

Inicialmente o ToBI foi desenvolvido para avaliar a ocorrência de soroconversão após a vacinação de seres humanos (HENDRIKSEN et al., 1988; 1989). A partir disso, e baseado nos princípios dos 3 Rs, foi avaliada a possibilidade desse método determinar os

títulos de antitoxina diftérica (ZUCKER & MURPHY, 1984) e tetânica em soros de animais ou humanos previamente imunizados (HENDRIKSEN et al., 1989a; 1991). O ToBI mostrou-se um teste de fácil realização, sensível e altamente reprodutível, de modo que o processo de validação teve início em 1994 com Hendriksen e colaboradores (HENDRIKSEN et al., 1994; VAN DER GUN et al., 1996; LENSING et al., 2002) e em 2005 foi incluído na Farmacopéia Européia (5^a edição) para o controle de potência de tétano. No entanto, o método alternativo proposto pela Farmacopéia Européia para o componente diftérico é o método de células Vero (FARMACOPÉIA EUROPEIA, 2008).

A Farmacopéia Brasileira menciona que métodos sorológicos podem ser utilizados, desde que devidamente validados (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2004). Nesse contexto o nosso estudo se mostrou importante pois teve como objetivo a validação do ToBI para se tornar um método oficial de controle de potência dos componentes diftérico e tetânico. Uma vez que a determinação da potência de vacinas de difteria e tétano pelo método de soroneutralização requer a imunização de cobaias, o ToBI representaria uma redução do uso de animais. Já para o controle da potência de soros hiperimunes antitetânico e antidiftérico, o ToBI representaria a substituição dos animais utilizados.

Alguns estudos têm relatado que o teste ToBI demonstra ser específico, preciso, sensível, simples e menos variável em relação aos testes preconizados *in vivo* (HENDRIKSEN et al., 1988, 1991). O teste ToBI apresenta algumas vantagens em relação ao teste de soroneutralização (*in vivo*), como mostrado no quadro 3.

Quadro 3: Vantagens e desvantagens do teste ToBI (*in vitro*) e do teste de soroneutralização (*in vivo*)

	ToBI	Método de soroneutralização <i>in vivo</i> (método FDA)
Vantagens	<ul style="list-style-type: none"> • Substituição da etapa SN ou o desafio • Dados quantitativos (título de anticorpo) • Fácil monitoramento de consistência de produção • Baixo custo • Possibilitar ensaios com muitas amostras • Maior agilidade 	<ul style="list-style-type: none"> • Método oficial da Farmacopéia Brasileira • Capacidade de realizar uma resposta imunológica complexa
Desvantagens	<ul style="list-style-type: none"> • Necessitar de animais na etapa de soroneutralização • Não está incluído na Farmacopéia Brasileira 	<ul style="list-style-type: none"> • Utiliza grande número de animais • Alto custo • Impossibilita ensaios com muitas amostras • Diferenças entre espécies podem não reproduzir a resposta imunológica na espécie-alvo (seres humanos) • Baixa reprodutibilidade dos resultados inter- e intra-laboratórios • Elevado número de ensaios inválidos • Maior tempo de liberação dos lotes

Atualmente existem grupos de pesquisa interessados em métodos que se enquadram no conceito dos 3Rs no campo do controle da qualidade de vacinas. As razões para o crescimento dessas pesquisas são diversas e vão além do bem-estar animal. Fatores econômicos, aspectos de segurança, relevância científica e unificação de metodologias são igualmente importantes.

A diferença essencial entre o teste ToBI e outras opções de métodos alternativos para o ensaio de potência reside no fato deste ser um teste imunoenzimático simples, mas capaz de quantificar anticorpos neutralizantes específicos que inibem a ação da toxina.

A resposta imunológica durante o processo de imunização envolve um mecanismo complexo, que vai desde a apresentação de antígeno até a proliferação de plasmócitos e produção de anticorpos. Essa complexidade não pode ser facilmente mimetizada em sistemas *in vitro*, levando a dificuldade de desenvolvimento de testes de potência que não utilizem animais. No caso do ToBI essa dificuldade é transposta, uma vez que os componentes da resposta imunológica, ou seja, anticorpos neutralizantes, são analisados *ex vivo*.

O ToBI tem a grande vantagem de combinar um ensaio *in vitro* com a complexidade inerente ao sistema imunológico através de uma etapa de imunização *in vivo*. No ToBI a potência é determinada através da quantificação indireta de toxina não neutralizada por anticorpos formados em cobaias imunizadas com vacina. Além disso, o ToBI possui outra grande vantagem pois não requer infra-estrutura sofisticada e onerosa como as necessárias para a manipulação de cultura de células.

Os primeiros estudos que mostram o desenvolvimento do ToBI, foram realizados pelo grupo do Prof. Coenraad Hendriksen com o objetivo de titular anticorpos em soro humano em 1988 e 1989 (Tabela 24). Inicialmente os autores realizaram a comparação da titulação de anticorpos tetânicos obtida com os testes de soroneutralização (SN) *in vivo* e os testes *in vitro*, ELISA e ToBI (HENDRIKSEN et al., 1988). A comparação para titulação de anticorpos diftéricos e tetânicos, também foi realizada entre o teste de SN *in vivo*, o teste com células Vero e o ToBI (HENDRIKSEN et al., 1989a). Nos dois estudos foi demonstrado que, dentre os tipos de teste analisados, o ToBI foi a melhor alternativa *in vitro* tanto para titulação de anticorpos diftéricos quanto para tetânicos presentes em soros humanos, apresentando alta correlação entre o ToBI e o teste oficial de SN *in vivo*.

Ainda no ano de 1989 foi publicado um estudo propondo a aplicação do ToBI para o controle de potência do componente diftérico presente em amostras de vacinas. Hendriksen e colaboradores (HENDRIKSEN et al., 1989b) aplicaram o ensaio ToBI para estimar o título de antitoxina diftérica em soro de camundongos imunizados com 12 lotes de vacinas DTP-polio e DT-polio, demonstrando boa correlação entre o ToBI e o teste de células Vero, o método *in vitro* aceito oficialmente no instituto onde o estudo fora conduzido.

Em 1991 Hendriksen e colaboradores (1991) propuseram que o ensaio ToBI fosse utilizado no controle da qualidade para determinação de potência do componente tetânico presente em vacinas de DTP-polio e DT-polio. Mais uma vez, o ensaio ToBI demonstrou boa correlação quando comparado com os testes de SN e de desafio, ambos *in vivo*.

A aplicação do ToBI para determinação da potência do componente tetânico presente em vacinas veterinárias, também foi avaliada (HENDRIKSEN et al., 1994). Esse trabalho comparou alguns ensaios *in vitro*, dentre eles o ToBI, o ELISA e o teste de hemaglutinação, com o teste de SN *in vivo*. Os estudos concluíram que o ToBI e o ELISA apresentaram melhor correlação com o teste *in vivo* e que são apropriados para avaliar potência de toxóide tetânico em vacinas de uso veterinário.

Tabela 24: Estudos que utilizaram o ToBI para avaliação de soroconversão ou da potência de imunobiológicos de uso humano

REFERÊNCIAS	APLICAÇÃO DO ToBI	TIPO DE AMOSTRA
HENDRIKSEN et al. 1988; 1989a	Avaliar a soroconversão após a vacinação de seres humanos; comparação com o teste de SN <i>in vivo</i> .	Soro humano
HENDRIKSEN et al. 1989b	Determinação de potência de componente diftérico; comparação com o teste de SN <i>in vivo</i> .	Soro de camundongos imunizados
HENDRIKSEN et al. 1991	Determinação de potência de componente tetânico; comparação com os testes de SN e desafio <i>in vivo</i> .	Soro de camundongos imunizados
VAN DER GUN et al. 1996	Validação do ensaio ToBI para determinação de potência do componente tetânico; comparação com o desafio <i>in vivo</i> .	Soro de camundongos imunizados
HONG et al. 1996	Soroconversão para vacinas de difteria e tétano no Vietnam.	Soro humano
VANDENBERG et al. 1999	Comparação entre os ensaios <i>in vitro</i> (ELISA , TOBI e Células Vero) e desafio <i>in vivo</i> para determinação de componente diftérico.	Soro de camundongos, cobaias e coelhos imunizados
WINSNES et al. 1999	Correlação entre desafio <i>in vivo</i> e ensaios <i>in vitro</i> para determinação de potência de vacinas tetânicas.	Soro de cobaias imunizadas
WALORY et al. 2000	Comparação de métodos sorológicos para detecção de anticorpos antidiftéricos.	Soro humano
MATOS et al., 2002	Correlação entre teste de SN <i>in vivo</i> e ToBI para determinação de potência do componente tetânico.	Soro de cobaias imunizadas com vacinas dT e DTP
MARCOVISTZ et al., 2002	Correlação entre teste de SN <i>in vivo</i> , ToBI e teste com células Vero, para determinação de potência do componente diftérico.	Soro de cobaias imunizadas
SONOBE et al., 2007	ToBI modificado para utilização de anatoxina no lugar da toxina; comparação com teste de SN <i>in vivo</i> .	Soro de cobaias imunizadas

Em 1996 foi publicado o primeiro estudo de validação do ensaio ToBI para avaliação de potência do toxóide tetânico em vacinas para uso humano (VAN DER GUN et al., 1996) como alternativa ao teste de desafio *in vivo*. Esse trabalho utilizou amostras de soro de camundongos imunizados com as vacinas DTP, DT e TT (toxóide tetânico). O estudo mostrou boa correlação com exceção de dois lotes, onde o ToBI superestimou os valores de potência, o que pode ter sido explicado pelo efeito adjuvante da toxina pertussígena na potência de tétano. Entretanto, o estudo de Matos e colaboradores (2002) verificou que os valores de potência do ToBI foram superiores aos obtidos pelo teste oficial *in vivo*, para o soro de cobaias imunizadas com as vacinas dT e DTP.

Winsnes e colaboradores em 1999 correlacionaram os resultados de ensaio *in vivo* e ensaios *in vitro* para determinação de potência de vacinas tetânicas para uso humano. Os resultados demonstraram boa correlação entre o teste de soroneutralização *in vivo* e o ELISA ($r= 0,93$) e o ToBI ($r= 0,97$). Nesse estudo os autores também verificaram a possibilidade de determinar a potência diftérica e tetânica na mesma amostra de soro animal.

Walory e colaboradores em 2000 publicaram um estudo de comparação de métodos sorológicos para detecção de antitoxina diftérica em soro humano. Os melhores resultados de correlação com o ensaio de SN *in vivo* foram o ELISA ($r= 0,81$) e o ToBI ($r=0,93$)

No Brasil, foram publicados alguns estudos demonstrando boa correlação do ToBI com o método *in vivo* de SN, para os componentes diftérico (MARCOVISTZ *et al*, 2002), tetânico (MATOS *et al*, 2002) e uma modificação do teste utilizando toxóide em vez de toxina (SONOBE et al., 2007).

Entretanto o INCQS teve dificuldades para implementar o ToBI na rotina de liberação de lotes a partir dos protocolos e estudos disponíveis na literatura. Além disso, informações mais precisas quanto aos parâmetros de validação avaliados nos estudos, na maioria das vezes não estavam disponíveis de forma clara.

Por outro lado, dos estudos encontrados na literatura, poucos avaliaram a potência dos componentes diftérico e tetânico no ToBI em soro de cobaia e nenhum em soro hiperimune.

No nosso estudo também foram levantadas algumas questões importantes e que não havia sido previamente pesquisada sobre fatores que poderiam interferir nos resultados de potência do ToBI. Alguns deles foram: a interferência de componentes do

soro de cobaia, a especificidade do método e a possibilidade de reações cruzadas, os critérios de validação de ensaio através da confecção de gráficos de controle e a metodologia utilizada para o cálculo de potência.

O desenvolvimento de um protocolo e a validação do ToBI pelo INCQS são de extrema importância para a introdução do ToBI nas etapas de controle de potência dos componentes diftérico e tetânico de alguns imunobiológicos e sua posterior inclusão na Farmacopéia Brasileira. Como descrito na sua missão, o INCQS deve ser uma “referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária”, além disso, cabe aos laboratórios de controle nacionais estimular a padronização de novas metodologias no controle da qualidade de imunobiológicos, repassá-las aos laboratórios produtores e promover estudos colaborativos (METZ et al., 2002).

Consideramos que com o presente estudo algumas etapas preliminares para padronização do ToBI foram vencidas e a partir dele torna-se possível seguir rumo ao estudo interlaboratorial e propor sua inclusão nas monografias da Farmacopéia Brasileira.

6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos no presente estudo nos permite concluir, que:

1 – Os gráficos de controle foram considerados uma importante ferramenta para identificar ensaios inválidos. Cerca de 10% dos ensaios diftéricos e 7% dos ensaios tetânicos foram considerados inválidos segundo gráficos de controle;

2 – A presença de outros componentes do soro animal não interfere no resultado do ensaio *in vitro*;

3 – Concluímos que é possível determinar a potência diftérica e tetânica na amostra de soro colhida na quarta semana. Essa constatação representa um refinamento do teste;

4 – A comparação dos resultados do produtor (*in vivo*) com dados preliminares do ToBI (*in vitro*) demonstrou uma boa correlação tanto para o componente diftérico quanto para o componentes tetânico;

5 – Concluímos que o método ToBI apresenta linearidade, especificidade e precisão (intra e inter-ensaio) satisfatórias e que é um ensaio confiável, rápido e conveniente para avaliar a potência de componentes diftérico e tetânico presentes tanto em vacinas como em soros hiperimunes.

7. PERSPECTIVAS

- Estabelecer a correlação entre os valores de potência determinados pelo método ToBI com os valores determinados pelo modelo atual *in vivo* de rotina com maior número de amostras de vacinas e soros hiperimunes;
- Verificar a necessidade de determinação de um novo valor mínimo de potência preconizado pelo ToBI para cada componente e cada produto;
- Avaliar a reprodutibilidade dos ensaios de potência de componentes diftéricos e tetânicos de soros e vacinas, através de realização de estudos colaborativos com laboratórios produtores;
- Propor a inclusão do método *in vitro* ToBI à Farmacopéia Brasileira nas monografias de teste de potência de vacinas e soros antidiftéricos e antitetânicos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTWEB – 3Rs and Alternatives Organizations. Disponível em: <http://caat.jhsph.edu/international_alternatives/> Acesso em: 12 jan. 2010.

AOAC – Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th Edition. William Horwitz (ed). Maryland: AOAC International, 2000.

BAE, K. et al. Innovative vaccine production technologies: the evolution and value of vaccine production technologies. Arch Pharm Res., v. 32, n. 4, p. 465-480, 2009.

BALLS, M. et al. Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on validation of toxicity test procedures. ATLA, v. 18, p. 313–37, 1990.

BHATIA, R.; PRABHAKAR, S.; GROVER, V. K. Tetanus. Neurol India, v. 50, n. 4, p. 398-407, dec. 2002.

BRASIL. DECRETO Nº 78.231, DE 12 DE AGOSTO DE 1976. Dispõe Sobre a Organização das Ações de Vigilância Epidemiológica, Sobre o Programa Nacional de Imunizações, Estabelece Normas Relativas a Notificação Compulsoria de Doenças, e da Outras Providencias. Diário Oficial da União, 13 ago. 1976.

BRASIL. LEI Nº 8.080, DE 19 DE SETEMBRO DE 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes, e dá outras providências. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, 20 de setembro de 1990.

BRASIL. RESOLUÇÃO RE Nº 899, DE 29 DE MAIO DE 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. Diário Oficial da União; Poder Executivo, 02 jun. 2003a.

BRASIL. DECRETO N° 4.725, DE 9 DE JUNHO DE 2003. Aprova o Estatuto e o Quadro Demonstrativo dos Cargos em Comissão e das Funções Gratificadas da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, e dá outras providências. Diário Oficial da União, 2003b.

BRASIL. RESOLUÇÃO RDC N° 73, DE 21 DE OUTUBRO DE 2008. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para procedimento de liberação de lotes de vacinas e soros hiperimunes heterólogos para consumo no Brasil e também para exportação. Diário Oficial da União; Poder Executivo, 22 out. 2008.

CDC – CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Disiases — 6th Edition – 2000.

DATASUS. Ministério da Saúde/SVS. Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2008/d0102.def>> Acesso em: 25 set. 2009.

ECVAM. Statement on the application of the TOBI test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use. 15th meeting at the European Centre for the validation of Alternative Methods, Ispra, Itália, 5-6 December 2000.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2004. 4^a edição, fascículo 5 (parte II).

FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2008. 6^a edição.

FEIJÓ, R.B.; SÁFADI, M.A. Immunizations: three centuries of success and ongoing challenges. J Pediatr (Rio J), v. 82, n. 3 (Supl), 2006.

FERNANDES, T. Vacina Antivariólica: seu primeiro século no Brasil (da vacina jenneriana à animal). História, Ciências, Saúde. Manguinhos, v. VI, n. 1, p. 29-51, 1999.

GUPTA, R.K.; HIGHAM, S.; GUPTA, C.K.; ROST, B.; SIBER, G.R. Suitability of Vero cell method for titration of diphtheria antitoxin in the United States potency test for diphtheria toxoid. Biologicals, v. 22, n. 1, p. 65–72, mar. 1994.

HONG, H.A. et al. Validation of combined toxin-binding inhibition test for determination of neutralizing antibodies against tetanus and diphtheria toxins in a vaccine field study in Viet Nam. *Bull World Health Organ.*, v. 4, n. 3, p. 275-82, 1996.

HENDRIKSEN, C.F. et al. The toxin binding inhibition test as a reliable in vitro alternative to the toxin neutralization test in mice for the estimation of tetanus antitoxin in human sera. *J Biol Stand*, v. 16, n. 4, p. 287-297, 1988.

HENDRIKSEN, C.F.; VAN DER GUN, J.W.; KREEFTENBERG, J.G. Combined estimation of tetanus and diphtheria antitoxin in human sera by the in vitro Toxin-Binding Inhibition (ToBI) test. *J Biol Stand*, v. 17, n. 2, p. 191-200, 1989a.

HENDRIKSEN, C.F.; VAN DER GUN, J.W.; KREEFTENBERG, J.G. The use of the Toxin Binding Inhibition (ToBI) test for the estimation of the potency of the diphtheria component of vaccines. *J Biol Stand*, v. 17, n. 3, p. 241-247, 1989b.

HENDRIKSEN, C.F. et al. The use of the in vitro toxin binding inhibition (ToBI) test for the estimation of the potency of tetanus toxoid. *Biologicals*, v. 19, n. 1, p. 23-29, jan. 1991.

HENDRIKSEN, C.F. et al. Interlaboratory validation of in vitro serological assay systems to assess the potency of tetanus toxoid in vaccines for veterinary use. *Biologicals*, v. 22, n. 3, p. 257-268, sep. 1994.

HENDRIKSEN, C.F. Refinement, reduction, and replacement of animal use for regulatory testing: current best scientific practices for the evaluation of safety and potency of biologicals. *ILAR J*, v. 43 (Supl), p. 43-48, 2002.

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde [Fiocruz]. *Atividades Institucionais 2001/2004*, Rio de Janeiro: 2004.

LENSING, H.H. et al. Collaborative study for the establishment of two European Pharmacopoeia Biological Reference Preparations for serological potency testing of tetanus vaccines for veterinary use. *Dev Biol*, v. 111, p. 69-76, 2002.

LEVI, G.C.; KALLÁS, E.G. Varíola, sua prevenção vacinal e ameaça como agente de bioterrorismo. *Rev Assoc Med Bras*, v. 48, n. 4, p. 357-362, 2002.

MARCOVISTZ, R. et al. Potency control of diphtheria component in adsorbed vaccines by in vitro neutralization tests. *Biologicals*, v. 30, n. 2, p. 105-112, 2002.

MARTINS, R.M.; MAIA, M.L.S.; HOMMA, A. Breve História das Vacinações. In: FARHAT, C. K.; WECKX, L.Y.; CARVALHO, L.H.; SUCCI, R.C. *Imunizações: fundamentos e práticas*. 5 ed. São Paulo: Atheneu, cap. 1, p. 3-23, 2008.

MATOS, D.C.S. et al. Immunogenicity test of tetanus component in adsorbed vaccines by toxin binding inhibition test. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 6, p. 909-13, 2002.

MENDOZA, N. et al. Existing antibacterial vaccines. *Dermatologic Therapy*, v. 22, p. 129-142, 2009.

METZ, B. et al. Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. *Vaccine*, v. 20, n. 19-20, p. 2411-30, jun. 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Imunizações 30 anos. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de atenção á saúde. Imunizações. Calendário de vacinação da criança. Disponível em: <<http://vilamulher.terra.com.br/voce-sabe-a-idade-certa-para-cada-vacina-8-1-55-29.html>> Acesso em: 10 nov. 2009.

MIRANDA, D.P.; HENRIQUES, C.M.P. Imunobiológicos e Vigilância Sanitária. In: BUSS P.M. (Org). Vacinas, Soros e Imunizações no Brasil. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, cap. 6, p. 125-130, 2005.

MIYAJI, E.N. et al. Induction of neutralizing antibodies against diphtheria toxin by priming with recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing CRM(197), a mutant diphtheria toxin. *Infect. Immun*, v. 69, p. 869–874, 2001.

MOKROUSOV, I. *Corynebacterium diphtheriae*: genome diversity, population structure and genotyping perspectives. *Infect Genet Evol.*, v. 9, n. 1, p. 1-15, Jan. 2009.

PATEL, A.K.; DAVIDSON, T.M. Bacterial diseases: diphtheria, cat-scratch disease, gonorrhoea, necrotizing fasciitis. In: HARRIS J.P.; WEISMAN M.H. (Eds.) *Head and Neck Manifestations of Systemic Disease*. New York: Informa Healthcare, p. 145-167, 2007.

PIMENTEL, A.M.; ROCHA, M.A.W. Difteria. In: FARHAT, C. K.; WECKX, L.Y.; CARVALHO, L.H.; SUCCI, R.C. *Imunizações: fundamentos e práticas*. 5 ed. São Paulo: Atheneu, cap. 22, p. 242-252, 2008.

RHEE, P. et al. Tetanus and trauma: a review and recommendations. *J Trauma*, v. 58, n. 5, p. 1082-1088, 2005.

ROCHA, M.A.W.; PIMENTEL, A.M. Tétano. In: FARHAT, C. K.; WECKX, L.Y.; CARVALHO, L.H.; SUCCI, R.C. *Imunizações: fundamentos e práticas*. 5 ed. São Paulo: Atheneu, cap. 23, p. 253-262, 2008.

ROGERS, L.C.; FRYKBERG, R.G. Tetanus Prophylaxis for Diabetic Foot Ulcers. *Clin Podiatr Med Surg*, v. 23, p. 769–775, 2006.

ROPER, M.H.; VANDELAER, J.H.; GASSE, F.L. Maternal and neonatal tetanus. *Lancet*, v. 370, n. 9603, p. 1947–1959, December 2007.

RUSSEL, W.M.S.; BURCH, R.L. The principles of humane experimental technique. Londres: Methuen, 1959.

SONOBE, M.H. et al. Determination of low tetanus or diphtheria antitoxin titers in sera by a toxin neutralization assay and a modified toxin-binding inhibition test. *Braz J Med Biol Res*, v. 40, n. 1, p. 69-76, 2007.

TEIXEIRA, L. A.; ALMEIDA, M. de: Os primórdios da vacina antivariólica em São Paulo: uma história pouco conhecida. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos*, v. 10, p. 475-498, 2003.

TEMPORÃO, J.G. O Programa Nacional de Imunização (PNI): origens e desenvolvimento. *História, Ciências e Saúde*, v. 10, p. 601-617, 2003.

TEMPORÃO, J.G.; NASCIMENTO, M.V.L.; MAIA, M.L.S. Programa Nacional de Imunizações (PNI): história, avaliação e perspectivas. In: BUSS, P.M.; TEMPORÃO, J.G.; CAVALHEIRO, J.R. (Org). *Vacinas, soros e imunizações no Brasil*. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, cap. 5, 2005.

U.S. FDA, CBER. Guidance for industry for the evaluation of combination vaccines for preventable diseases: production, testing and clinical studies, 1997.

VAN DER GUN, J. et al. Validation of the toxin-binding inhibition (ToBI) test for the estimation of the potency of the tetanus toxoid component in vaccines. *Dev Biol Stand.*, v. 86, p. 199-206, 1996.

VANDENBERG, J.; VAN DER GUN, J.W.; HENDRIKSEN, C.F. Evaluation of toxin neutralisation in test systems for diphtheria antibody assessment. *Dev Biol Stand.*, n. 101, p. 105-111, 1999.

VITEK, C.R. Diphtheria. *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 304, p. 71-94, 2006.

WALORY, J.; GRZESIOWSKI, P.; HRYNIEWICZ, W. Comparison of four serological methods for the detection of diphtheria anti-toxin antibody. *J Immunol Methods*, v. 245, n. 1-2, p. 55-65, 2000.

WINSNES, R. et al. Serological assays as alternatives to the Ph Eur challenge test for batch release of tetanus vaccines for human use. *Dev Biol Stand.*, n. 101, p. 277-88, 1999.

WHO – World Health Organization. Manual of laboratory methods for testing of vaccine used in the WHO Expanded Program on Immunization. WHO/VSQ/97.04, 1997.

WHO – World Health Organization. DRAFT Guidelines for Independent Lot Release of Vaccines by Regulatory Authorities, 2009.

ZUCKER, D.R.; MURPHY, J.R. Monoclonal antibody analysis of diphtheria toxin. I. localization of epitopes and neutralization of cytotoxicity. *Mol. Immunol.* v. 21, p. 785-793, 1984.