

ELIZABETH PORTO REIS LUCAS

**ESTABELECIMENTO DO SORO ANTIBOTRÓPICO
DE REFERÊNCIA NACIONAL**

**PPGVS/INCQS
FIOCRUZ
2006**

**ESTABELECIMENTO DO SORO ANTIBOTRÓPICO
DE REFERÊNCIA NACIONAL**

ELIZABETH PORTO REIS LUCAS

Curso de Especialização em Produtos, Ambientes e
Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

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

Orientadora: MARIA APARECIDA AFFONSO BOLLER

**RIO DE JANEIRO
2006**

FOLHA DE APROVAÇÃO

ESTABELECIMENTO DO SORO ANTIBOTRÓPICO DE REFERÊNCIA NACIONAL

ELIZABETH PORTO REIS LUCAS

Monografia submetida à Comissão Examinadora composta pelos professores e tecnologistas 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 Especialista em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Aprovado:

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Prof. Maria Aparecida Affonso Boller

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Prof. Humberto Pinheiro de Araújo

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Prof. Wlamir Corrêa de Moura

Orientador: _____ (INCQS/FIOCRUZ)

Prof. Maria Aparecida Affonso Boller

Rio de Janeiro

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Lucas, Elizabeth Porto Reis
Estabelecimento do Soro Antibotrópico de Referência Nacional / Elizabeth Porto Reis
Lucas. - Rio de Janeiro: FIOCRUZ / INCQS, 2006.

xiv, 30 f.: quad., graf., fig.

Orientador: Maria Aparecida Affonso Boller

Dissertação (especialização) – Instituto de Controle da Qualidade em Saúde -
INCQS, Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos,
Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária, 2006.

1. Soro Antibotrópico. 2. Padrão de Referência Nacional – Dissertação
I. Boller, Maria Aparecida Affonso II. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional
de Controle da Qualidade em Saúde, Programa de Pós Graduação em Vigilância
Sanitária. III. Título.

Dedico este trabalho ao meu pai e a memória de minha mãe, por terem feito parte dos incentivadores da trajetória do meu trabalho. A meu marido por me ajudar sempre que precisei me ausentar das tarefas de casa, de esposa e de mãe para que eu pudesse galgar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, e aos meus amigos do Setor de Soros Antipeçonhentos, pela ajuda no trabalho realizado.

Para mim, sábio não é aquele que proclama palavras de sabedoria, mas sim aquele que demonstra sabedoria em seus atos (São Gregório).

RESUMO

No Brasil ocorrem aproximadamente 20 mil acidentes ofídicos por ano. Em cerca de 90% dos casos em que a serpente é reconhecida, o gênero *Bothrops* é o responsável, sendo este o envolvido no maior número de casos de acidentes com serpentes venenosas no Novo Mundo. A soroterapia é o tratamento adequado para diminuir a letalidade dos acidentes causados por esses animais. O tratamento consiste na aplicação nos pacientes de um soro específico constituído por um concentrado de anticorpos. A segurança e a eficácia da imunoterapia anti-venenamento estão intimamente relacionadas à pureza e uma cuidadosa determinação da potência do soro (atividade biológica). A metodologia atual em camundongos, ainda apresenta importantes limitações e apesar de adotada como metodologia farmacopeica oficial, não é uma metodologia validada. Observações preliminares identificaram principalmente um alto índice de invalidação de ensaios e uma baixa repetibilidade e reprodutibilidade, representado por diferenças significativas no ensaio de potência nos resultados obtidos pelo INCQS e pelos laboratórios produtores, enfatizando a necessidade de aperfeiçoar a metodologia analítica para a determinação da potência do Soro Antibotrópico. De acordo com as recomendações de “Workshop on the Standardization and Control of Antivenoms”, coordenado pela “Quality Assurance and Safety of Biologicals Unit” da OMS, o estabelecimento de venenos e antivenenos de referência é essencial para a padronização destes ensaios para permitir a comparação lote a lote, assim como a comparação entre laboratórios. Idealmente as atividades dos antivenenos devem ser expressas em unidades neutralizantes de toxina baseada em um padrão nacional ou regional. Foi realizado pelo INCQS um “pool” de soros antibotrópicos representativos de todos os produtores nacionais. A Dose Efetiva 50% (DE₅₀) foi determinada através de oito ensaios válidos para verificar sua potência e a variabilidade de seus resultados. Os resultados foram consistentes e foi calculada a potência obtendo um resultado de 6,92 mg/mL, recebendo a denominação de BRA/ANTIBOT/001.

Palavras-chave: Soro Antibotrópico, Padrão de Referência, Determinação da Potência.

ABSTRACT

In Brazil 20 thousand poisonous snakebites accidents are reported per year. About 90% of cases in which the serpent is recognized, the *Bothrops* genus is the responsible, being this involved in the largest number of accidents with poisonous serpents in the New World.

Serum-therapy is the proper treatment for reducing the lethality of snakebites caused by these animals. Treatment consists in administrating to the patient a specific serum produced with a concentrate of antibodies. The safety and efficacy of the anti-poison immunotherapy depends on the purity and on a careful determination of potency (biological activity). The current official methodology using mice presents sever limitations and, even being an official pharmacopoeia monograph has not been validated. Preliminary observations has identified mainly a high level of invalid assays and a low repeatability and reproducibility, revealed by significant differences in the results of potency assay obtained by INCQS and by producer laboratories, emphasizing the need of refining the analytical methodology for the potency detection of anti-bothropic sera. According to there commendations of the “Workshop on the Standardization and Control of Antivenoms”, coordinated by “Quality Assurance and Safety of Biologicals Unit” of OMS the establishing of standards for venoms and antivenoms is essential to the standardization of these assays allowing a lot-to-lot comparison, as so as an inter-laboratory comparison. Ideally the activity of antivenoms should be expressed in Neutralizing Units of a toxin based in a National or Regional Standard. A pool of anti-bothropic sera was made by the INCQS with anti-sera from all national producers. The Effective dose 50% (ED₅₀) was determinate using eight valid assays to verify its potency and the homogeneity of its results. The results showed to be consistent and the potency has been calculated obtaining the value 6.92 mg/mL, and called BRA/ANTIBOT/001.

Keywords: Anti-bothropic Serum, Standard of Reference, Determination of potency.

LISTA DE SIGLAS

BRA/ANTIBOT/001 - Soro Antibotrópico de Referência Nacional

CECAL - Centro de Criação de Animais

CENEPI - Centro Nacional de Epidemiologia

CGPNI - Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações

CPPI - Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos

DL₅₀ - Dose Letal 50%

DE₅₀ - Dose Efetiva 50%

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FUNED - Fundação Ezequiel Dias

IB - Instituto Butantan

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IP – Intraperitoneal

IVB - Instituto Vital Brazil

POP – Procedimento Operacional Padrão

SAL - Serviço de Animais de Laboratório

SES-RJ – Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro

SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológica

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|----------|-----------------------------|----|
| Figura 1 | <i>Bothrops alternatus</i> | 05 |
| Figura 2 | <i>Bothrops atrox</i> | 05 |
| Figura 3 | <i>Bothrops erytromelas</i> | 05 |
| Figura 4 | <i>Bothrops jararaca</i> | 06 |
| Figura 5 | <i>Bothrops jararacussu</i> | 06 |
| Figura 6 | <i>Bothrops moojeni</i> | 06 |
| Figura 7 | <i>Bothrops neuwiedi</i> | 07 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|-----------|---|----|
| Quadro 1 | Serpentes Botrópicas de Importância Médica no Brasil | 01 |
| Quadro 2 | Acidentes por Animais Peçonhentos no Rio de Janeiro - 2003 | 02 |
| Quadro 3 | Acidente Botrópico: Classificação quanto à gravidade e quantidade aproximada de veneno a ser neutralizada | 11 |
| Quadro 4 | Número de Ampolas de Soro para Tratamento de Acidentes Ofídicos | 11 |
| Quadro 5 | Fases do Processo de Produção de Soros | 14 |
| Quadro 6 | Relação dos Lotes do “pool” Candidato a Soro Antibotrópico | 17 |
| Quadro 7 | Esquema de Diluições da DL ₅₀ | 19 |
| Quadro 8 | Esquema de Diluições do Ensaio de Soroneutralização | 21 |
| Quadro 9 | Combinação Ponderada de Ensaios | 23 |
| Quadro 10 | DE ₅₀ do Soro Antibotrópico – BRA/ANTIBOT/001 | 25 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | |
|-----------|---|----|
| Gráfico 1 | Acidentes por Animais Peçonhentos no Rio de Janeiro | 02 |
| Gráfico 2 | Soros Antibotrópicos X Soros Antipeçonhentos (período de 2001-2005) | 03 |
| Gráfico 3 | Controle das DE ₅₀ | 24 |

ÍNDICE

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 01 |
| 1.1 | HISTÓRICO | 03 |
| 1.2 | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 04 |
| 1.3 | MECANISMO DE AÇÃO DO VENENO | 08 |
| 1.4 | A SOROTERAPIA | 09 |
| 1.5 | A PRODUÇÃO DE SOROS | 12 |
| 1.5.1 | <i>Teste de Controle da Qualidade do Produto Final</i> | 13 |
| 2 | OBJETIVOS | 15 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 15 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 15 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 16 |
| 3.1 | MATERIAIS | 16 |
| 3.1.1 | <i>Veneno Botrópico de Referência</i> | 16 |
| 3.1.2 | <i>Soro Antibotrópico de Referência</i> | 16 |
| 3.1.3 | <i>Camundongos Suíço-Albinos</i> | 18 |
| 3.2 | MÉTODOS | 18 |
| 3.2.1 | <i>Obtenção do pool de Soro antibotrópico</i> | 18 |
| 3.2.2 | <i>Determinação da Dose Letal 50%</i> | 19 |
| 3.2.3 | <i>Determinação da Dose Efetiva 50%</i> | 20 |
| 3.2.4 | <i>Controle do Lote de Referência</i> | 21 |
| 3.2.5 | <i>Critérios de Validação do Soro Candidato</i> | 21 |
| 4 | RESULTADOS | 22 |
| 5 | DISCUSSÃO | 26 |
| 6 | CONCLUSÕES | 27 |
| 7 | REFERÊNCIAS | 28 |

1 INTRODUÇÃO

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por uma morbidade maior que qualquer outro grupo de serpentes venenosas no Novo Mundo. As espécies mais importantes são, *Bothrops asper* na América Central e *Bothrops atrox* e *Bothrops jararaca* na América do Sul. No Brasil, as espécies de *Bothrops* são responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos notificados (Brasil, 1999-2000). Entre os acidentes por animais peçonhentos, o ofídico é o principal deles, pela sua frequência e gravidade. No **quadro 1** as principais espécies de *Bothrops* encontradas no Brasil.

Os acidentes ofídicos têm importância médica em virtude de sua grande frequência e gravidade. A padronização atualizada de condutas de diagnóstico e tratamento dos acidentados é imprescindível, pois as equipes de saúde, com frequência considerável, não recebem informações desta natureza durante o curso de graduação ou no decorrer da atividade profissional (Brasil, 2001).

Quadro 1: Serpentes Botrópicas de Importância Médica no Brasil

| NOME CIENTÍFICO | NOMES POPULARES | DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA |
|----------------------------------|---|--|
| <i>Bothrops alternatus</i> (1) | Urutu Urutu-cruzeiro Cruzeira | RS, SC, PR, SP, MS e MG |
| <i>Bothrops atrox</i> (2) | Surucucurama Jararaca-do-norte Combóia Jararaca-do-rabo-branco | AC, AM, RR, PA, AP, MA, RO, TO, CE e MT (áreas de floresta) |
| <i>Bothrops erythromelas</i> (3) | Jararaca-da-seca | PI, CE, RN, PB, PE, AL, SE, BA e MG (áreas xerófitas/caatinga) |
| <i>Bothrops jararaca</i> (4) | Jararaca Jararaca-do-rabo-branco | BA, MG, ES, RJ, SP, PR, SC e RS |
| <i>Bothrops jararacussu</i> (5) | Jararacuçu | BA, ES, RJ, SP, PR, MG, MT e SC |
| <i>Bothrops moojeni</i> (6) | Jararacão Jararaca Caiçara | PI, TO, DF, GO, MG, SP, MT, MS e PR |
| <i>Bothrops neuwiedi</i> (7) | Jararaca-pintada | Em todo país, exceto Amazônia |

1. Poucos relatos de casos. Acidentes graves; 2. Responsável pela maioria dos registros de acidentes na Amazônica; 3. Distúrbios de coagulação são manifestações mais comumente registradas. Acidentes com poucas alterações locais, geralmente benignos; 4. Principal agente em MG, ES, RJ e SP. Casos graves ou óbitos pouco frequentes; 5. Acidentes relatados, principalmente em SC. Acidentes graves ou casos fatais; 6. Responsável pela maioria dos registros de acidentes no oeste de SP e de MG e dos atendimentos em Goiânia/GO; 7. Distribuídas pelo território nacional, com exceção da Amazônia. Fonte: CENEPI/FNS (2006)

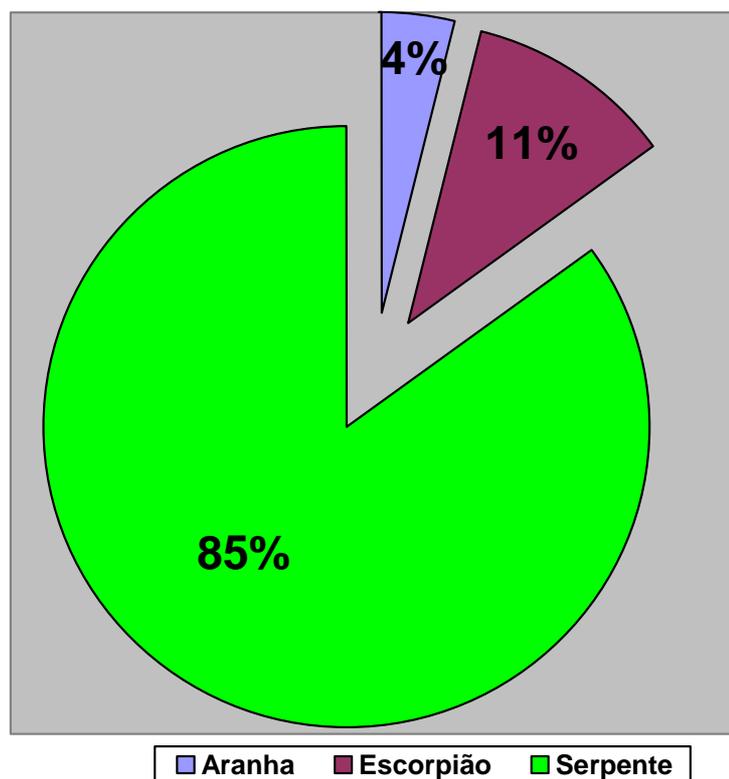
No Estado do Rio de Janeiro, os acidentes ofídicos lideram a lista de acidentes por animais peçonhentos.(quadro 2 e gráfico1).

Quadro 2: Acidentes por Animais Peçonhentos no Rio de Janeiro - 2003

| ANO | ARANHA | ESCORPIÃO | SERPENTE | TOTAL % |
|--------------|------------|-------------|-------------|-----------|
| 1990 | 33 | 96 | 733 | 85 |
| 1991 | 84 | 248 | 924 | 74 |
| 1992 | 60 | 201 | 974 | 79 |
| 1993 | 64 | 188 | 971 | 79 |
| 1994 | 82 | 132 | 979 | 82 |
| 1995 | 55 | 129 | 906 | 83 |
| 1996 | 49 | 109 | 724 | 82 |
| 1997 | 58 | 112 | 734 | 81 |
| 1998 | 60 | 95 | 513 | 77 |
| 1999 | 56 | 83 | 664 | 83 |
| 2000 | 56 | 87 | 705 | 83 |
| 2001 | 57 | 95 | 697 | 82 |
| TOTAL | 714 | 1575 | 9524 | 81 |

Fonte: SES-RJ/SUSC/ADIN

Gráfico 1: Acidentes por Animais Peçonhentos no Rio de Janeiro – 2003

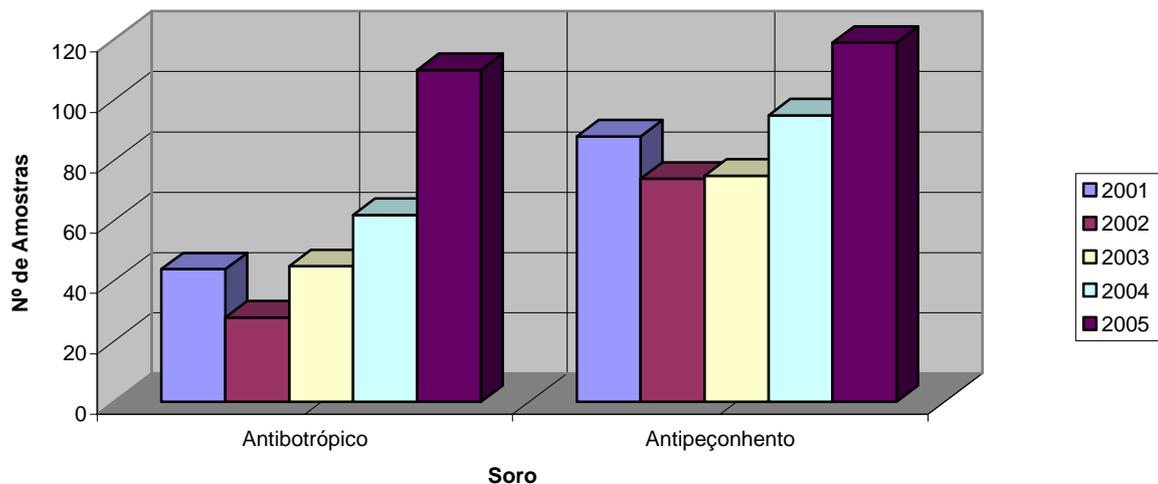


Fonte: SES-RJ/SUSC/ADIN

No Brasil a produção de Soro Antibotrópico é em maior número em relação a outros Soros Antipeçonhentos, devido a enorme incidência de casos ocorridos com este gênero (**gráfico 2**).

Gráfico 2: Soros Antibotrópicos X Soros Antipeçonhentos (período de 2001-2005)

Fonte: INCQS (Setor de Soros Antipeçonhentos)



1.1 HISTÓRICO

Desde a mais remota antiguidade o homem sempre sofreu envenenamentos causados por picadas de animais peçonhentos, que são os que produzem substâncias tóxicas e apresentam um aparelho especializado para inoculação desta substância que é o veneno, através de glândulas que se comunicam com dentes ocos, ou ferrões, ou agulhões, por onde o veneno passa ativamente (Instituto Butantan, 2006).

João Batista Lacerda foi um dos pioneiros no estudo do ofidismo. Na década de 1870 realizou trabalhos sobre toxicologia dos venenos e sistemática ofídica, identificando novas espécies na fauna brasileira, como *B. jararacussu* e *B. urutu* (Dias, 1966).

O Doutor Vital Brazil médico sanitaria, consciente do grande número de acidentes com serpentes peçonhentas no Estado passou a realizar experimentos com os venenos

ofídicos. Baseando-se nos primeiros trabalhos com soroterapia realizados pelo francês Albert Calmette, desenvolveu estudos sobre soros contra o veneno de serpentes, descobrindo-a sua especificidade, ou seja, cada tipo de veneno ofídico requer um soro específico, preparando com o veneno do mesmo gênero de serpente que causou o acidente. O Instituto Butantan foi criado por Vital Brazil em fevereiro de 1901 para a produção do soro antipestoso, no combate a epidemia de peste bubônica que surgia no Porto de Santos (Brasil, 1987). A prioridade inicial do Instituto era produzir soros antivenenos com especificidade para serpentes da América do Sul. Em 1984, foi lançado o Programa de Auto-Suficiência Nacional em Imunobiológicos, para atender à demanda nacional por estes produtos e tentar eliminar a necessidade de importação, sendo relevante a participação do Instituto Butantan, Instituto Vital Brazil e Fundação Ezequiel Dias.

1.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O veneno das serpentes do gênero *Bothrops* são caracterizados por importantes lesões teciduais locais, como hemorragias, necrose e edema, assim como alterações no sistema de coagulação sanguínea. Esses complexos fenômenos fisiopatológicos são devidos a efeitos sinérgicos de enzimas ativas e toxinas presentes nos venenos (Ownby, 1990; Bjarnason & Fox, 1994 e Gutierrez, 1995).

As espécies de *Bothrops* mais significativas para a saúde pública, são muito abundantes, com uma ampla distribuição geográfica, e com populações importantes nas diversas regiões do país, são as: *Bothrops alternatus*, *Bothrops atrox*, *Bothrops erythromelas*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi* (FUNDACENTRO, 2001).

Figura 1: *Bothrops alternatus*



Figura 2: *Bothrops atrox*



Figura 3: *Bothrops erythromelas*



Figura 4: *Bothrops jararaca*



Figura 5: *Bothrops jararacussu*



Figura 6: *Bothrops moojeni*



Figura 7: *Bothrops neuwiedi*



1.3 MECANISMO DE AÇÃO DO VENENO

As principais atividades tóxico-farmacológicas presentes no veneno botrópico são: hemorrágica, procoagulante, necrosante, proteolítica, fibrinolítica e fosfolipásica (Francischetti, 1998; Gutierrez, 1998; Castro, 1999; Camey, 2002).

Os venenos de serpentes contêm uma mistura de variados peptídeos e proteínas farmacologicamente ativas que induzem uma grande diversidade de sintomas nos pacientes (Bourguignon, 2000). Entre os principais efeitos fisiopatológicos dos venenos destacam-se: lesões locais por danos capilares e necroses teciduais, ações coagulantes e anticoagulantes, hipotensão aguda e dor. A responsabilidade de vários efeitos biológicos tem sido creditada principalmente as proteases e fosfolipases presentes nos venenos (Soares, 1998; Francischetti, 1998, Bourguignon, 2000).

A atividade coagulante do veneno botrópico é dividida em trombina-símile e pró-coagulante. A primeira ocorre pela ação de enzimas trombina-símiles, que são serinoproteases ácidas, glicosiladas. Transformam diretamente o fibrinogênio em fibrina. Com exceção da enzima purificada de *B. insularis*, nenhuma outra enzima trombina-símile foi inibida pela heparina. Algumas enzimas trombina-símiles purificadas dos venenos de *B. jararaca* também liberam bradicinina. A segunda pela ação de duas enzimas ativadoras do fator X, dependentes do cálcio, formadas pela união de duas cadeias polipeptídicas e parecem ser isoformadas da mesma enzima. A ação destas enzimas pode ser inibida pela heparina. Além de ativar o fator X o veneno botrópico possui também ativadores de protrombina (fator II), as metaloproteinases, inclusive o veneno de *B. jararaca* (Brasil, 1987).

1.4 A SOROTERAPIA

Um dos principais avanços no tratamento foi o desenvolvimento da SOROTERAPIA, que consiste na aplicação no paciente, de um soro contendo um concentrado de anticorpos. A soroterapia constitui a principal terapia para o acidente botrópico. Sua indicação baseia-se nos critérios clínicos de gravidade (**quadro 3**). No local da picada as manifestações mais freqüentes são: edemas, necrose, equimose e sangramento. Alterações sistêmicas, como a incoagulabilidade sanguínea (avaliado pela determinação do tempo de coagulação), pode ser acompanhada de fenômenos hemorrágicos como gengivorragia, hematúria, sangramento por ferimentos recentes. Oligoanúria e/ou alterações hemodinâmicas, como hipotensão arterial persistente e choque que definem os casos como graves (Brasil, 1999-2000). Cada ampola de soro antibotrópico contém 10 mL e neutraliza no mínimo 50 mg de veneno – referência de *B. jararaca* (soroneutralização em camundongos). A administração do soro heterólogo deve ser feita o mais precocemente possível, por via intravenosa, em solução diluída em soro fisiológico ou glicosado, e a quantidade dependerá da gravidade do acidente (**quadro 4**). O controle da eficácia do soro antibotrópico deve ser realizado pela determinação do TC (tempo de coagulação) 12 e 24 horas após o término da soroterapia. Se decorridas as 12 horas, o TC permanecer incoagulável (acima de 30 minutos), ou se após 24 horas não estiver normalizado, recomenda-se dose a dose adicional de 2 ampolas de soro antibotrópico.

A presença do edema e sua extensão é utilizada como critério de gravidade, especialmente quando o paciente é avaliado nas primeiras horas do acidente. Sendo a progressão do edema usual no acidente botrópico, pacientes admitidos tardiamente com freqüência apresentam edema extenso. Nesses casos a utilização desse critério como única variável na avaliação deve ser feito de modo criterioso. Uma vez que a capacidade neutralizante do processo inflamatório pelo antiveneno é limitada, é discutível a administração de dose adicional de antiveneno aos pacientes, baseado apenas na progressão do edema. É importante, após a soroterapia, acompanhamento contínuo de alterações locais e sistêmicas para a detecção e tratamento precoce das complicações e, eventualmente, a administração de doses adicionais de antivenenos. É recomendado, quando necessário, o uso de antimicrobianos, a fim de evitar complicações locais decorrentes do ferimento causado pela picada. E também pode ser feito o debridamento cirúrgico, a aspiração do líquido de bolhas, (pois tem sido observada a presença de veneno nessas bolhas), e em último caso a

fasciotomia (descompressão cirúrgica) em casos de síndrome compartimental evidente e ainda profilaxia do tétano, embora seja raro o relatado após a picada de serpentes (Cardoso, 2003).

Um soro antiveneno ideal deve ser seguro e eficaz, sem provocar efeitos adversos quando administrado por via sistêmica. Bioquimicamente falando, o melhor soro deve apresentar uma alta pureza e atividade, com um mínimo de conteúdo de proteínas totais. Clinicamente, é aquele que apresenta a melhor eficiência terapêutica com a menor dose e sem efeitos colaterais (WHO – 1969).

Atualmente, mais de um século depois, com algumas poucas modificações, a soroterapia, como proposta por Calmette e Vital Brazil, ainda é o único tratamento específico contra os acidentes ofídicos. Os métodos atualmente utilizados por praticamente todos os produtores de soros antipeçonhentos, em nível mundial, para o isolamento e concentração dos anticorpos contra venenos e seus fragmentos derivados enzimaticamente, são aperfeiçoamentos da técnica originalmente descrita por Pope em 1938, e modificada por Harms em 1948 e Pope & Stevens em 1951, constituindo-se basicamente pela precipitação salina, com ou sem digestão enzimática e desnaturação pelo calor. Constantes aperfeiçoamentos e padronização das várias etapas envolvidas na produção, purificação e controle da qualidade, resultaram em um puro, seguro e eficiente concentrado de fragmentos F(ab')₂ de IgG. Também são utilizadas preparações contendo fragmentos Fab ou a molécula inteira de IgG (Theakston, 2003).

O soro antitetrápico é uma solução que contém imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de eqüinos hiperimunizados, com antígeno do gênero *Bothrops*, composto por venenos das serpentes *Bothrops jararaca* (50%), *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops neuwiedi* (12,5% cada). Contém em cada mililitro imunoglobulinas suficientes para neutralizar, no mínimo 5 mg de veneno de referência de *Bothrops jararaca*.

Quadro 3 – Acidente Botrópico: Classificação quanto à gravidade e quantidade aproximada de veneno a ser neutralizada.

| Gravidade (avaliação inicial) | Manifestações e tratamento | | | | |
|----------------------------------|------------------------------------|---|----------------------------------|--|-------------------------|
| | Locais: principalmente edema | Sistêmicas hemorragia grave, choque, anúria | Tempo de Coagulação (TC) * | Quantidade aproximada de veneno a ser neutralizada (mg) | Via de administração |
| Leve (L) | Discreto | Ausentes | Normal ou alterado | 100 | IV ** |
| Moderada (M) | Evidente | Ausentes ou presentes | Normal ou alterado | 200 | IV |
| Grave (G) | Intenso | Evidentes | Normal ou alterado | 300 | IV |

Quadro 4 - Número de Ampolas de Soros para Tratamento de Acidentes Ofídicos

| ACIDENTE | GRAVIDADE | | | TIPO DE SORO |
|--------------------------|-----------|----------|-------|---|
| | Leve | Moderado | Grave | |
| <i>Bothrops jararaca</i> | 2 - 4 | 4 - 8 | 12 | Soro Antibotrópico/ Soro Antibotrópico-crotálico/ Soro Antibotrópico-laquéico |

Fonte: CENEP/FNS (2006)

Os soros utilizados no Brasil são produzidos pelo Instituto Butantan, Instituto Vital Brazil, Fundação Ezequiel Dias e Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológico e são distribuídos pelo Ministério da Saúde, através da FUNASA.

1.5 A PRODUÇÃO DE SOROS

Os soros são utilizados para tratar intoxicações provocadas pelo veneno de animais peçonhentos. A primeira etapa da produção de soros anti-peçonhentos é a extração do veneno também chamado peçonha. Após a extração, a peçonha é submetida a um processo chamado liofilização, que desidrata e cristaliza o veneno. A produção do soro obedece às seguintes etapas:

- A extração do veneno de animais peçonhentos.
- Liofilização
- Tratando-se do botrópico, o veneno proveniente das cinco espécies mais prevalentes no Brasil: (*B. jararaca*: 50%; *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. jararacussu* e *B. neuwiedi*: 12,5% cada) é diluído e injetado em cavalos. Este processo leva 40 dias e é chamado hiperimunização.
- Após a hiperimunização, é realizada uma sangria exploratória, retirando uma amostra de sangue para medir o teor de anticorpos produzidos em resposta às injeções do antígeno.
- Quando o teor de anticorpos atinge o nível desejado, é realizada a sangria final retirando-se cerca de quinze litros de sangue de um cavalo de 500 kg em três etapas, com um intervalo de 48 horas.
- No plasma são encontrados os anticorpos. O soro é obtido a partir da purificação e concentração desse plasma, onde se inicia o processo da produção do soro (**quadro 5**).
- As hemácias são devolvidas ao animal, em um processo chamado plasmaferese. Esta técnica de reposição reduz os efeitos colaterais provocados pela sangria do animal.
- O soro purificado é concentrado através de ultrafiltração molecular, submetido à filtração clarificante e esterilizante.
- O soro é estocado entre 2 e 8 °C e submetido aos testes de controle da qualidade.
- Após o controle da qualidade, o soro é formulado: diluído para alcançar o título desejado (> 5,0 mg/mL), adicionando o conservante fenol (< 0,35%), isotonicado ((NaCl – 0,7 a 0,9%), tendo o pH ajustado na faixa entre 6 e 7.

No final do processo, o soro obtido é submetido a testes de controle da qualidade.

- **ATIVIDADE BIOLÓGICA:** para verificação da qualidade de anticorpos produzidos.
- **ESTERILIDADE:** para a detecção de eventuais contaminações durante a produção.
- **INOCUIDADE:** para avaliação de segurança quanto ao uso humano.
- **PIROGÊNIO:** para detectar a presença de substância e contaminantes que provocam alterações de temperatura nos pacientes (febre).
- **TESTES FÍSICO-QUÍMICOS:** são utilizados para qualificar e quantificar os componentes do soro.

1.5.1 TESTE DE CONTROLE DE QUALIDADE DO PRODUTO FINAL

- **TESTE DE SEGURANÇA BIOLÓGICA**

Estelilidade e Pirogênio

- **TESTES FÍSICO-QUÍMICOS**

Volume médio, teor de fenol, teor de sulfato de amônia, ph, teor de cloreto de sódio, proteínas e nitrogênio protéico.

- **DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA**

Dose efetiva 50% (DE₅₀)

Quadro 5 – Fases do Processo de Produção de Soros

| | FASE | OBJETIVO | MECANISMO | CONTROLE DA QUALIDADE |
|----|--|--|---|--|
| 1 | Tamponamento do plasma | Melhorar a qualidade | Adicionar tampão ácido cítrico pH 4,8 | Verificar o pH |
| 2 | Purificação do plasma | Conservar e manter estável | Adicionar fenol e centrifugar | Analisar teor de fenol |
| 3 | Desnaturação das proteínas | Precipitar e eliminar a albumina e pigmentos | Adicionar sulfato de amônia e centrifugar | Analisar teor de sulfato de amônia |
| 4 | Tamponamento e salinização da suspensão de proteínas | Otimizar a digestão | Adicionar ácido clorídrico ou fosfato de cálcio pH 3,2 e cloreto de sódio e centrifugar | Verificar o pH |
| 5 | Filtração molecular | Eliminar imunoglobulinas | Purificar por cromatografia | Verificar a turbidez |
| 6 | Diálise | Eliminar resíduos de sulfato de amônia | Filtrar em tubos de hemodiálise | Analisar teor de sulfato de amônia |
| 7 | Clarificação | Eliminar a turbidez | Adicionar hidróxido de alumínio gel | Analisar teor de hidróxido de alumínio |
| 8 | Esterilização | Purificar o produto | Adicionar etanol | Analisar teor de etanol |
| 9 | Estabilização e preservação | Estabelecer a validade do produto | Adicionar timerosal | Analisar teor timerosal |
| 10 | Padronização do produto final | Verificar parâmetros de qualidade | Coletar amostras do “bulk” final | Analisar o “bulk” final |

Fonte: Instituto Butantan (2006)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral produzir e estabelecer através de testes com resultados consistentes o Soro Antibotrópico de Referência Nacional - BRA/ANTIBOT/001.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter um pool de amostras de soro antibotrópico (384 ampolas de 10 mL), provenientes de 4 produtores nacionais (Instituto Vital Brasil, Instituto Butantan, Fundação Ezequiel Dias e Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológico).

Realizar titulações independentes do soro antibotrópico candidato a referência nacional, proveniente dos quatro produtores.

Obter pelo menos oito resultados válidos na determinação da Dose Efetiva 50 % (DE₅₀), pelo método *in vivo*, preconizado pela Farmacopéia Brasileira.

Calcular a potência do soro BRA/ANTIBOT/001.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 VENENO BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA (BRA/BOT/05) - O Veneno Botrópico de Referência utilizado foi um “pool” de veneno de várias serpentes do gênero *Bothrops*, produzido pelo Instituto Butantan, liofilizado, mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em frascos de 30 mg padronizado pela determinação da Dose Letal 50% e aferido pelo INCQS.

3.1.2 SORO ANTIBOTRÓPICO CANDIDATO A REFERÊNCIA (BRA/ANTIBOT/001) – O Soro Antibotrópico Candidato a Referência foi obtido com um “pool” de amostras de soros antibotrópicos (384 ampolas de 10 mL) dos laboratórios: IB, IVB, FUNED e CPPI; produzido pelo INCQS e aliquotado em frascos de 3 mL.

Quadro 6- Relação dos Lotes do “pool” do Candidato a Soro BRA/ANTIBOT/001:

| AMOSTRA | LOTE | PRODUTOR | QUANTIDADE | TOTAL |
|---------|-------------|-----------------|------------|-------|
| 1298/00 | 0004052-A | I. Butantan | 10 | 160 |
| 1299/00 | 0004052-B | I. Butantan | 10 | |
| 1300/00 | 0004052-C | I. Butantan | 10 | |
| 3762/98 | 9807070-A | I. Butantan | 15 | |
| 3763/98 | 9807070-B | I. Butantan | 15 | |
| 3764/98 | 9807070-C | I. Butantan | 15 | |
| 3093/98 | 980043-A | I. Butantan | 10 | |
| 3094/98 | 980043-B | I. Butantan | 15 | |
| 3095/98 | 980043-C | I. Butantan | 15 | |
| 4277/98 | 9808078-A | I. Butantan | 15 | |
| 4278/98 | 9808078-B | I. Butantan | 15 | |
| 4279/98 | 9808078-C | I. Butantan | 15 | |
| 1102/98 | 980201 | I. Vital Brazil | 18 | |
| 3483/98 | 980604-A | I. Vital Brazil | 14 | |
| 3484/98 | 980604-B | I. Vital Brazil | 14 | |
| 4828/98 | 980707 | I. Vital Brazil | 21 | |
| 5242/98 | 980909 | I. Vital Brazil | 26 | |
| 1986/00 | 991113 | I. Vital Brazil | 19 | |
| 3470/00 | 000801 | I. Vital Brazil | 03 | |
| 4254/00 | 000905 | I. Vital Brazil | 03 | |
| 4570/00 | 000902 | I. Vital Brazil | 02 | |
| 5166/00 | 001110 | I. Vital Brazil | 03 | |
| 3235/98 | 97070815 | FUNED | 10 | 119 |
| 4980/98 | 971015/20 | FUNED | 15 | |
| 5474/98 | 980929/05-B | FUNED | 15 | |
| 5476/98 | 980929/05-C | FUNED | 23 | |
| 2967/99 | 990504-18 | FUNED | 21 | |
| 3492/99 | 990517-22 | FUNED | 16 | |
| 4670/99 | 990915-45 | FUNED | 19 | |
| 418/00 | B02/99 | CPPI | 21 | 21 |

3.1.3 CAMUNDONGOS SUÍÇO-ALBINOS

Nos ensaios *in vivo* para o estabelecimento do Soro Antibotrópico de Referência Nacional foram utilizados camundongos suíço-albinos de 18 a 22 gramas de ambos os sexos, sadios, procedentes do CECAL da Fiocruz e aclimatados no SAL do INCQS por 24 horas onde foram efetuados os ensaios e obtidos os resultados relacionados à presente proposta.

A manipulação dos animais de laboratório teve como base o Manual de Biossegurança (POP 65.1000.003), Boas Práticas em Experimentação Animal (POP 65.3340.002) e o Ensaio de Potência para o Soro Antibotrópico – *in vivo* (POP 65.3440.004).

3.2 MÉTODOS

O método utilizado teve como base a soroneutralização *in vitro* e posterior inoculação em camundongos, como preconizado pela Farmacopéia Brasileira.

3.2.1 OBTENÇÃO DO POOL DE SORO ANTIBOTRÓPICO

O Soro Antibotrópico Candidato a Referência foi obtido com um “pool” de amostras de soros antibotrópicos (384 ampolas de 10 mL) dos laboratórios: IB, IVB, FUNED e CPPI; (**quadro 6**), aliquotado em frascos, constituindo um lote de 915 ampolas com 3 mL, estocado entre 4 e 8 °C no INCQS. Após o “pool” das amostras de soros antibotrópicos avaliou-se quanto à esterilidade bacteriana e fúngica, pelo método de filtração por membrana (BRASIL, 2004).

3.2.2 DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50% (DL₅₀)

Reconstituir a preparação liofilizada na concentração de 1 mg/mL com solução fisiológica 0,85%. Efetuar diluições em progressão geométrica, utilizando fator de diluição constante, não superior a 1,5, e igualando os volumes finais (**quadro 7**).

Inocular, por via intraperitoneal, volume de 0,5 mL por camundongos de cada diluição em grupos de, no mínimo, 10 camundongos suíço-albinos de 18 a 22g. Observar os animais no período de 24 e 48 horas após inoculação e registrar o número de mortos em cada diluição. Calcular a DL₅₀ utilizando método estatístico (Probitos). A faixa de resposta (porcentagem de mortes) deve estar compreendida entre 10% e 90%, formando a curva de regressão que deve apresentar relação linear. Os limites de confiança não devem ser amplos, indicando melhor precisão do ensaio . Expressar o resultado em microgramas de veneno por 0,5 mL.

Quadro 7 – Esquema de Diluições da DL₅₀

| µg veneno/camundongo | Solução de Veneno (mL) | SALINA (mL) |
|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| 62.2 | 0,50 | 2,70 |
| 51.8 | 0,38 | 2,82 |
| 43.2 | 0,29 | 2,91 |
| 36.0 | 0,22 | 2,98 |

Fonte: Manual da Qualidade do INCQS

3.2.3 DETERMINAÇÃO DA DOSE EFETIVA 50% (DE₅₀)

Efetuar diluições progressivas do soro em solução fisiológica a 0,85%, utilizando fator de diluição constante, não superior a 1,5, de maneira que o volume final após a mistura com a dose desafio de veneno seja idêntico em todos os tubos de ensaio. Reconstituir e diluir o veneno de referência com solução fisiológica 0,85% e adicionar em cada tubo volume constante, de modo que cada dose a ser inoculada por animal contenha 5DL₅₀ (**quadro 8**).homogenizar e incubar a mistura a 37 °C por 45 minutos. Inocular, por via intraperitoneal, volume de 0,5 mL por camundongo, de cada mistura, em grupos de, no mínimo, 8 camundongos suíço-albinos de 18 a 22g. Observar os animais no período de 24 e 48 horas após inoculação e registrar o número de vivos de cada mistura. Calcular a Dose Efetiva 50% (DE₅₀) em microgramas, utilizando método estatístico (Probit). A faixa de resposta (porcentagem de sobrevivência) deve estar compreendida entre 10% e 90%, formando a curva de regressão que deve apresentar relação linear. Os limites de confiança não devem ser amplos, indicando melhor precisão do ensaio. Calcular a potência em miligramas por mililitro, utilizando a equação:

$$\text{Potência (mg/mL)} = \frac{\text{TV} - 1 \times \text{DL}_{50} \text{ do veneno}}{\text{DE}_{50}}$$

Em que TV = número de DL₅₀ utilizadas por camundongo na dose teste de veneno.

O título da potência é expresso em miligramas de veneno neutralizados por 1 mL da amostra.

Quadro 8 – Esquema de Diluição do Ensaio de soroneutralização

| VENENO (mL) | SORO (mL) | SALINA (mL) |
|--------------------|------------------|--------------------|
| 2,8 | 0,50 | 2,70 |
| 2,8 | 0,38 | 2,82 |
| 2,8 | 0,29 | 2,91 |
| 2,8 | 0,22 | 2,98 |

Fonte: Manual da Qualidade do INCQS

3.2.4 CONTROLE DO LOTE CANDIDATO

ESTERILIDADE – para a detecção de eventuais contaminações de Bactérias e Fungos durante a manipulação do pool.

POTÊNCIA – DE_{50} – dose neutralizante necessária para proteger animais suscetíveis, contra o efeito de uma dose fixa de veneno de referência.

3.2.5 CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO DO SORO CANDIDATO

O método é o preconizado pela Farmacopéia Brasileira.

Para a realização do cálculo da DE_{50} (método estatístico Probit) deve ser utilizado o resultado de, pelo menos, três diluições consecutivas, sendo que a dose que protege 50% deve estar no intervalo compreendido entre a maior e a menor diluição do ensaio. A potência é calculada em miligramas por mililitro. A amostra é considerada satisfatória se a potência for $=$ ou $>$ 5,0 mg/mL. O laboratório deve ter procedimentos de controle da qualidade para monitorar a validade dos ensaios realizados. A aceitabilidade do valor obtido com a amostra de controle da qualidade deve ser verificada, no mínimo sete vezes antes que esta amostra seja usada como um controle da qualidade (REBLAS- 2002).

4 RESULTADOS

Foram realizados oito ensaios para o estabelecimento da DE₅₀ do soro antitoxinogênico de referência. O valor da DE₅₀, seus limites inferior e superior foram obtidos pelo método combinação dos resultados através da média ponderada referendado pela Farmacopéia Européia – 2005 (COMBIM) (**quadro 9**) para a obtenção do resultado final pela média. A DE₅₀ obtida pelo COMBIN foi **27,63µg/dose**, com um limite superior de **29,11µg/dose** e um limite inferior de **26,22 µg/dose** (**quadro 10**).

Quadro 9 - Combinação Ponderada de Ensaio

| DE ₅₀ | LI | LS | GL | Ln pot (M) | L(amplit) | t | Peso(W) | MW |
|------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------|----------------|-----------|-----------|
| 27,66 | 22,85 | 33,48 | 20 | 3,3200 | 0,3820 | 2,086 | 119,28 | 395,99 |
| 26,82 | 23,23 | 30,96 | 20 | 3,2891 | 0,2873 | 2,086 | 210,93 | 693,80 |
| 27,61 | 23,25 | 32,78 | 20 | 3,3182 | 0,3435 | 2,086 | 147,50 | 489,42 |
| 33,48 | 27,15 | 41,29 | 20 | 3,5109 | 0,4192 | 2,086 | 99,02 | 347,67 |
| 26,75 | 22,25 | 32,18 | 20 | 3,2865 | 0,3690 | 2,086 | 127,82 | 420,10 |
| 24,94 | 21,66 | 28,71 | 20 | 3,2165 | 0,2818 | 2,086 | 219,21 | 705,08 |
| 25,93 | 22,97 | 29,28 | 20 | 3,2554 | 0,2427 | 2,086 | 295,45 | 961,79 |
| 32,25 | 27,92 | 37,24 | 20 | 3,4735 | 0,2880 | 2,086 | 209,78 | 728,68 |
| | | | | 0,0000 | 0,0000 | 0,000 | 0,00 | 0,00 |
| | | | | 0,0000 | 0,0000 | 0,000 | 0,00 | 0,00 |
| | | | | 0,0000 | 0,0000 | 0,000 | 0,00 | 0,00 |
| | | | | 0,0000 | 0,0000 | 0,000 | 0,00 | 0,00 |
| | | | | 0,0000 | 0,0000 | 0,000 | 0,00 | 0,00 |
| | | | | 0,0000 | 0,0000 | 0,000 | 0,00 | 0,00 |
| N | GL total | W Total | MW total | M médio | t | s(Mmed) | LI | LS |
| 8 | 160 | 1428,99 | 4742,53 | 3,32 | 1,975 | 0,02645 | 3,2666 | 3,3710 |

Teste de homogeneidade:

| X ² calc | p | X ² tab |
|---------------------|--------|--------------------|
| 12,479 | 0,0859 | 14,067 |

Dados homogêneos

Teste de Grubbs para resultados aberrantes:

Valor máximo é válido

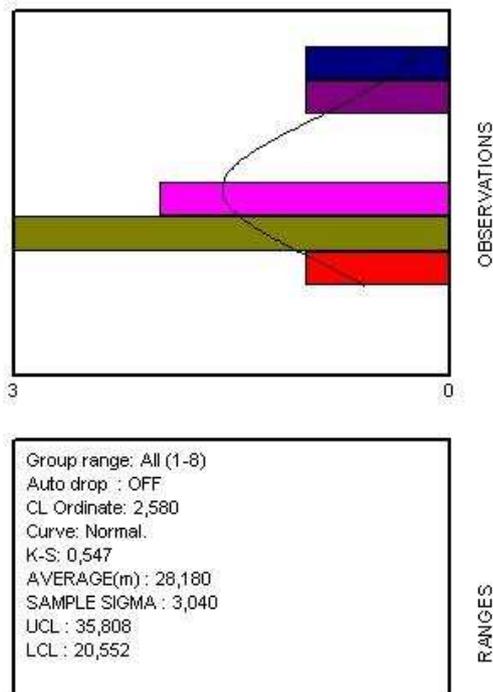
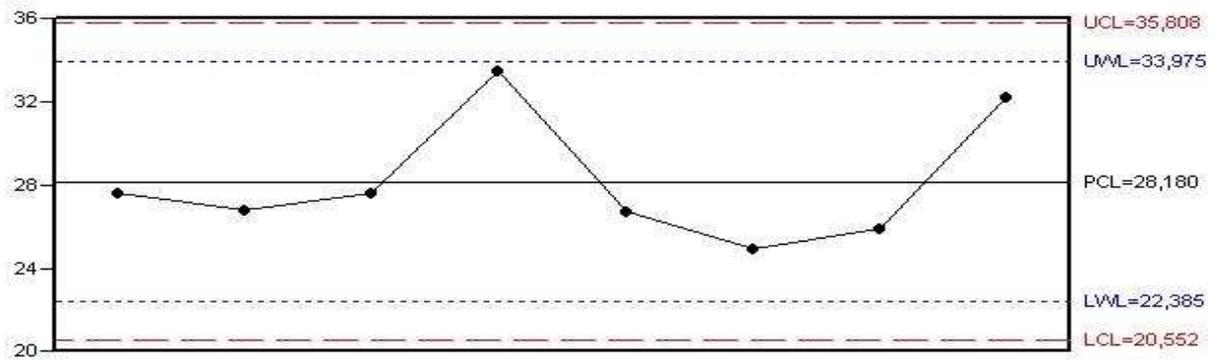
Valor mínimo é válido

A DE₅₀ obtida pelo COMBIN foi de 27,63 µg/dose

Fonte: European Pharmacopoeia 4

| | | |
|------------------|--------|---------|
| DE ₅₀ | 27,627 | µg/dose |
| Lim Inf | 26,22 | µg/dose |
| Lim sup | 29,11 | µg/dose |

Gráfico 3: Gráfico dos controles das DE₅₀



Quadro 10 – DE₅₀ do Soro Antibotrópico - BRA/ANTIBOT/001

| CÁLCULO DA DE₅₀ | |
|--|--------------|
| Limite Inferior µg/dose | 26,22 |
| DE₅₀ µg/dose | 27,63 |
| Limite Superior µg/dose | 29,11 |

Conforme descrito no POP 65.3440.005, a determinação da potência do Soro Antibotrópico é feita seguindo a fórmula:

$$\text{Potência} = \frac{(\text{TV}-1) \times \text{DL}_{50} \text{ do Veneno Botrópico de referência}}{\text{DE}_{50}}$$

RESULTADO DA POTÊNCIA DO SORO DE REFERÊNCIA

BRA/ANTIBOT/001

6,92 mg/mL

5 DISCUSSÃO

A Unidade da Garantia da Qualidade e Segurança do Biológicos da OMS organizou em fevereiro de 2001 em Londres um “Workshop on the Standardization and Control of Antivenoms”, para discutir o progresso na padronização e controle da qualidade de antivenenos. Esse encontro contou com a participação de especialistas de instituições acadêmicas, produtores de antivenenos e Autoridades Nacionais Regulatórias de 21 países e revisou a produção de antivenenos e métodos de controle da qualidade. A importância dos acidentes ofídicos com um problema de saúde pública foi novamente enfatizado. Os participantes concordaram que há muito espaço para aperfeiçoar a produção, o controle da qualidade e o perfil de segurança desses produtos.

Foi discutida a necessidade de uma melhor padronização tanto dos venenos quanto dos antivenenos, também conclui que padrões e materiais de referência internacionais não são apropriados no campo de antivenenos devido as consideráveis variações nas características dos venenos da mesma espécie de região para região. Porém recomendou o estabelecimento de padrões de referência nacionais ou regionais (THEAKSTON, 2003).

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nas 8 titulações (determinação do título e dos desvios médios), seguindo o descrito no POP – Ensaio de Potência para o Soro Antibotrópico – *in vivo* (65.3440.004) e no POP – Determinação da Dose Letal 50 dos Venenos *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* – *in vivo* (65.3440.006). Foi de extrema importância o estabelecimento e padronização do soro antibotrópico de referência nacional. A determinação da potência relativa do soro antibotrópico teste, frente a um soro antibotrópico de referência permitirá uma diminuição da variação dos resultados obtidos nos diferentes laboratórios. Os resultados apresentaram valores homogêneos no INCQS. O que é muito importante e significativo diante da necessidade de se estabelecer materiais de referência nacionais, com o objetivo de melhorar a determinação da potência biológica do soro antibotrópico. Concluindo que esta amostra candidata a um soro antibotrópico de referência nacional, poderá ser utilizada em ensaios de determinação da potência relativa do soro antibotrópico, recebendo a nomenclatura BRA/ANTIBOT/001.

7 REFERÊNCIAS

BJARNASON, J.B. & FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 62, p. 325-372, 1994.

BOAS Práticas em Experimentação Animal. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10. (65.3340.002).

BOURGUIGNON, S.C.; SILVA-JUNIOR, F.P.; CALHEIRO, E.B. Identification, Purification and Sequence of Potentiating Bradykinin Peptides from *Bothrops moojeni* venom. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, V. 33, v.1, p.165 - 2000.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1987, 53 p.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. Ofidismo 1999-2000. Disponível em:
http://www.funasa.gov.br/guia_epi/htm/doencas/acidentes_peconhentos/ofidismo.htm
Acesso em: 26 nov 2002.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2ª ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001, 120 p.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira. 4.ed. fasc. 5, parte II. São Paulo: Atheneu, 2003.

CAMEY, K.U.; VELARDE, D.T. & SÁNCHEZ, E.F. Pharmacological characterization of the venoms used in the production of Botropic antivenom in Brazil. **Toxicon**, v. 40, p. 501-509. 2002.

CARDOSO, JLC; WEN FH. Introdução ao ofidismo. In: Cardoso, JLC (Coord.) Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003. p.3-5.

CASTRO, H.,C.; FERNANDES, M.; ZINGALI, R.B. Identification of Bothrojaracin-like proteins in snake venoms from *Bothrops* species and *Lachesis muta*. **Toxicon**, v. 37, p. 1403-1416, 1999.

DETERMINAÇÃO da Dose Letal 50 dos Venenos *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* - In Vivo. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10. (65.3440.006).

DIAS, MV. Lacerda Fisiologista. Comemoração do Centenário de Nascimento de João Batista de Lacerda, 1846 – 1915. Museu Nacional, Rio de Janeiro, *Primordia Pharmacologiae in Brasíliã*, Sancti Pauli, MCMLXVI; 89-123.

ENSAIO de Potencia para o Soro Antibotrópico- *in vivo*. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10. (65.3440.004).

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, Immunosera for human use, animal. Cód 01/2003-0084 - pág 2938.

FINNEY DJ. (1971) Probit Analysis 3rd ed: Cambridge University Press. 333 p.

FRANCISCHETTI, I.M.B.; CASTRO, H.C.; ZINGALI, R.B. et al. *Bothrops sp.* Snake venoms: Comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 119C, n. (1), p. 21-29, 1998.

FUNDACENTRO. Ministério do trabalho e emprego. Prevenção de acidentes com animais peçonhentos. 1ª ed. São Paulo, 2001, 49 p.

GUIA de Vigilância Epidemiológica, 4ª ed. Cap 5. CENEPI/FNS. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/gve/gve0501a.htm> . Acesso em 08 fev 2006.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ Myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J.M.; LEON, G.; ROJAS, G. et al. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v. 36 n. 11, p. 1529-1538, 1998.

REBLAS. Habilitação de Laboratórios Analíticos em Saúde Segundo os Requisitos da ISO/IEC 17025. Revisão n° 01, Edição 02, 2002. p.41-42.

HARMS, A.J. The purification of antitoxic plasma by enzyme treatment and heat denaturation. **Biochemical Journal**, v. 42, p. 390-397, 1948

INSTITUTO BUTANTAN. Acidentes por Animais Peçonhentos. Instituto Butantan. Disponível em: <http://www.butantan.gov.br/novapagina/perguntas.htm> . Acesso em: 20 abr 2006

MANUAL de Biossegurança. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10. (65.1000.003).

MELGAREJO, AR Serpentes Peçonhentas: Principais grupos, identificação, veneno, acidentes e primeiros socorros. Instituto Vital Brazil, Rio de Janeiro. Disponível em: www.ivb.rj.gov.br/palestras/roteiro.doc. Acesso em: 09 ago.2006.

OWNBY, C.L. Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: Handbook of Toxicology. New York, Marcel Decker 1990. p. 601-654.

POPE, C.G. Desegregation of proteins by enzymes. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 19, p. 245-251, 1938.

POPE, C.G. & STEVENS, M.G. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. III. Further studies on enzyme systems which split the antitoxin molecule. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 32, p. 314-324, 1951.

PROCESSO de Fabricação de Soros. FUNED. Disponível em: http://www.funed.mg.gov.br/animais_peconhentos/informacoes_uteis/index.php. Acesso em: 08 abr 2006.

REVISTA “Série Didática” nº 2 Divisão de Desenvolvimento Cultural Norma Regulamentadora no 15 (NR 15) do Ministério do Trabalho. INSTITUTO BUTANTAN,

ROSENFELD G. Symptomatology, Pathology and Treatment of Snake Bites, in south América. In: BUCHERLW, BUCKLEY EG, DEULOFEU V, (Eds) Venomous Animals and their Venoms. New York: Academic Press, 1971. p345-841.

SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; HOMSI-BRANDEBURGO. M.I. et al. A rapid procedure for isolation of the lys-49 myotoxin-II from *Bothrops moojeni* (caissaca): biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. – **Toxicon**, v. 36, p. 503-514, 1998.

THEAKSTON, R.D.G. WARRELL, D.A.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on standardization and control of antivenoms. **Toxicon**, v.41, p. 541-557 2003.

WHO. World Health Organization – Norms relatives aux immunosérums d’origine animale. – **WHO Sér. Rapp. Tech.**, 1969. 413: 47-61.