

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Wildeberg Cál Moreira

DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO SOROLÓGICO ALTERNATIVO UTILIZANDO
RIFFT PARA AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE VACINAS CONTRA RAIVA DE USO
HUMANO

Rio de Janeiro

2018

Wildeberg Cál Moreira

DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO SOROLÓGICO ALTERNATIVO UTILIZANDO
RIFFT PARA AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE VACINAS CONTRA RAIVA DE USO
HUMANO

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Antônio Eugênio Castro Cardoso
de Almeida

Wlamir Correa de Moura

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Moreira, Wildeberg Cál

Desenvolvimento de ensaio sorológico alternativo utilizando rífft para avaliação da potência de vacinas contra raiva de uso humano. / Wildeberg Cál Moreira. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2018. 156 f. : il. ; fig. ; graf. ; tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

Orientador: Antônio Eugênio Castro Cardoso de Almeida.
Co-orientador: Wlamir Correa de Moura.

1. Vacinas Antirrábicas. 2. Imunoensaio. 3. Crescimento e Desenvolvimento. I. Título.

Development of alternative serological assay using rífft to the evaluation of the potency of human rabies vaccines.

Wildeberg Cál Moreira

DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO SOROLÓGICO ALTERNATIVO UTILIZANDO
RIFFT PARA AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE VACINAS CONTRA RAIVA DE USO
HUMANO

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em 10/12/2018.

BANCA EXAMINADORA

Ivano Raffaele V. de Filippis Capasso (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fiocruz

Marcelo Salabert Gonzalez (Doutor)
Departamento de Biologia Geral - UFF

Márcia Cristina Ribeiro Andrade (Doutor)
Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos - Fiocruz

Dedico este trabalho aos meus amados pais Wilde Moreira e Glória Cal Moreira que proporcionaram a possibilidade de estar aqui, nesta vida, crescer, estudar e evoluir.

AGRADECIMENTOS

A Deus artífice da vida.

Ao Dr. Wlamir Correa e Moura, pela orientação, disponibilidade, boa vontade de sempre, grande amizade e construção desta tese.

Ao Dr. Antônio Eugênio Castro Cardoso de Almeida pela orientação e enriquecimento do conteúdo deste trabalho.

Aos Diretores do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Drs. Eduardo Chaves Leal, Octávio Augusto França Presgrave e Antônio Eugênio Castro Cardoso de Almeida, por propiciarem as condições para a realização deste curso.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, pelo cuidado na qualidade do ensino.

À Dra. Carla de Freitas Campos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB), por possibilitar a minha transferência e pelo fornecimento dos animais.

À Presidente da Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz –, Dra. Nísia Trindade Lima.

À toda equipe do Laboratório de Vacinas Virais do Departamento de Imunologia do INCQS – Sras. Anna Christina Rosa Guimaraes e Simone Ferreira Teixeira Bastos pelo fornecimento das células; Sr. Dejaildo Marques da Silva pela manutenção dos animais; Sr. Dario Freitas da Silva pelo esmero na preparação dos materiais; Sra. Ivani Cutis dos Santos, Sra. Jéssica F.S. Freitas e Srta. Nathalia S. Machado pela execução dos experimentos.

Ao Instituto Butantan por fornecer a amostra de CVS e determinar o conteúdo de glicoproteína das vacinas.

Ao Me. Eduardo Jorge Rabelo Netto pelas amostras obtidas e Dr. Edson Roberto Alves de Oliveira pela correção da língua inglesa.

Aos amigos Ivani Cutis, Regina Lameirão, Lucia Maria Correa Werneck e Wlamir Correa de Moura por todos os dias desses quatro anos de estudos.

As equipes dos biotérios do ICTB e do Serviço de Animais de Laboratório pelo trato especial, manutenção e fornecimento dos animais.

Aos meus amados “amigos para sempre” da graduação que sempre estiveram comigo.

Aos colegas do doutorado e mestrado que em muito enriqueceram a minha trajetória na pós-graduação.

Aos doutores que participaram das bancas durante o curso de doutorado e contribuíram com suas sugestões.

Aos amigos Vivian Miranda Casanova e Silva e Jackson Vicente da Silva pela revisão da língua portuguesa.

A todos aqueles que auxiliaram direta ou indiretamente a execução desta tese, o meu muito obrigado.

CIÊNCIA E AMOR

“A ciência incha, mas o amor edifica.” —
Paulo. (1ª Epístola aos Coríntios, 8:1.)

A ciência pode estar cheia de poder, mas só o amor beneficia. ... Ensina que cada máquina deve servir como utilidade divina, no caminho dos homens para Deus, que somente se deveria transmitir a palavra edificante como dádiva do Altíssimo, que apenas seria justa a publicação dos raciocínios elevados para o esforço redentor das criaturas. Se a ciência descobre explosivos, esclarece o amor quanto à utilização deles na abertura de estradas que liguem os povos; se a primeira confecciona um livro, ensina o segundo como gravar a verdade consoladora. A ciência pode concretizar muitas obras úteis, mas só o amor institui as obras mais altas. Não duvidamos de que a primeira, bem interpretada, possa dotar o homem de um coração corajoso; entretanto, somente o segundo pode dar um coração iluminado. O mundo permanece em obscuridade e sofrimento, porque a ciência foi assalariada pelo ódio, que aniquila e perverte, e só alcançará o porto de segurança quando se render plenamente ao amor de Jesus - Cristo.

Caminho, verdade e vida, Francisco
Cândido Xavier, ditado pelo espírito
Emmanuel.

RESUMO

A letalidade da raiva está próxima de 100% e quinze milhões de pessoas recebem profilaxia pós-exposição anualmente. É imperioso garantir a qualidade dos produtos biológicos utilizados na prevenção desta zoonose. Os lotes de vacina têm a potência avaliada pelo teste do *National Institutes of Health* (NIH), baseado em imunização e desafio de camundongos. Este ensaio possui várias desvantagens, como a variabilidade significativa e problemas de bem-estar animal. Vários métodos *in vitro*, como o ensaio imunoenzimático (ELISA), têm sido propostos com base na qualidade e quantidade da glicoproteína (GLPTN) do vírus da raiva, mas também podem apresentar limitações como baixa sensibilidade, instabilidade e imprecisão. A estimativa da imunogenicidade baseada no título de anticorpos neutralizantes (AN), avaliada por um teste sorológico, como o Teste de Inibição de Foco Fluorescente Rápido Modificado (RFFITm), ainda não é aplicada de forma efetiva para a vacina humana. No entanto, uma concentração de AN pode ser usada como um preditor da eficácia clínica deste produto em humanos vacinados, o que pode ser aplicado na estimativa da potência da vacina. O objetivo deste estudo foi desenvolver e pré-validar um Ensaio Sorológico (ES) utilizando o RFFITm para determinar a potência de vacinas antirrábicas para uso humano, demonstrando sua Relevância e Confiabilidade. Verificar o limite inferior de imunogenicidade ao conteúdo viral de GLPTN capaz de induzir resposta em camundongos, utilizando RFFITm. O ensaio foi capaz de distinguir entre lotes potentes e subpotentes de vacinas. Houve concordância entre as potências determinadas pelo ES e o teste NIH. Os resultados demonstraram que o ES é um candidato confiável para a validação e inclusão em farmacopeias, obtendo redução e refinamento para o teste NIH. O menor teor de GLPTN pelo ES capaz de induzir resposta AN foi determinado.

Palavras-chave: Ensaio de potência, Vacina contra a raiva humana, Ensaio sorológico, RFFITm, Glicoproteína, Imunogenicidade, Desenvolvimento, Pré-validação.

ABSTRACT

Rabies lethality is close to 100% and annually 15 million people receive post-exposure prophylaxis. It is mandatory to ensure the quality of biological products used in the prevention of this zoonosis. The vaccine batches are assessed by the National Institutes of Health (NIH) test which based on mice immunization and challenge. This test has several disadvantages such as significant variability and animal welfare issues. Several in vitro methods like an Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) have been proposed based on the quality and quantity of glycoprotein (GLPTN) of rabies virus, but may also present limitations such as low sensitivity, instability and imprecision. The estimate of immunogenicity based on neutralizing antibody titer (Nab) evaluated by a serological test such as the Modified Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (mRFFIT), is not yet effectively applied for human vaccine. Nevertheless, a Nab concentration can be used as a predictor of clinical efficacy of this product in vaccinated humans, so, that can be applied in estimating the vaccine potency. The objective of this study was to develop and pre-validate a Serological Potency Test (SPT) using the mRFFIT to determine the potency of rabies vaccines for human use, demonstrating its relevance and reliability. Verify the lower limit of immunogenicity of the viral GLPTN content able to induce Nab response in mice by mRFFIT. The assay was able to distinguish between potent and sub-potent lots of vaccines. There was agreement between the potencies determined by the SPT and the NIH test. The results demonstrated that SPT is a viable candidate for validation and inclusion in pharmacopeias as a reduction and refinement for the NIH test. The lower GLPTN content by SPT able to induce Nab response was determined. The results were correlated and demonstrated that SPT was able to determine the GLPTN immunogenicity lower limit. Our findings suggest that a test based on rabies Nabs may represent an additional alternative for the evaluation of rabies vaccines. The lower GLPTN content by ES able to induce Nab response was determined.

Keywords: Potency assay, Human rabies vaccine, Serological assay, mRFFIT, Glycoprotein, Immunogenicity, Development, Pre-validation.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Fases da validação e etapas do desenvolvimento de ensaios de potência	42
Quadro 2 - Amostras de Vacinas Contra Raiva analisadas por ensaio.	46
Quadro 3 - Esquema de diluições do Soro Referência, soros teste, soro controle negativo e suspensão viral.	52
Quadro 4 - Desenho experimental para demonstrar a Relevância do ES.	54
Quadro 5 - Desenho experimental para avaliação do limite inferior de imunogenicidade.	56
Quadro 6 - Esquema de diluição e concentração de Glicoproteína de três lotes de vacina antirrábica.	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da sistematização da metodologia de pré-validação do Ensaio Sorológico.	45
Figura 2 - Série Histórica de Lotes de Vacina Contra Raiva Humana recebidos pelo Laboratório de Vacinas Virais do INCQS – FIOCRUZ, entre 2000 e 2017 e tendência da utilização de animais nos ensaios NIH e sorológico. n= 522.....	61
Figura 3 - (1) Intervalos de confiança (IC) e limites superior (LSC) e inferior (LIC) de 95% de confiança da potência relativa no ensaio EPNIH no esquema de duas e (2) uma dose de vacina contra raiva humana.....	63
Figura 4 - Análise da variância das potências obtidas no EPNIH e em três abordagens do ES cut-off $\geq 0,5$ UI/ mL (ab-OMS); título de AN em UI/ mL (ab-TAN) e cut-off $\geq 0,12$ UI/ mL (ab-ACIP).	71
Figura 5 - (1) Abordagens de cálculo da potência relativa; RMP- requerimento mínimo de potência ($\geq 2,5$ UI /dose). Correlação de Pearson do logaritmo das potências (2) pela ab-OMS; (3) ab-TAN; e (4) ab-ACIP. n= 9.	73
Figura 6 - (1) Coeficiente de concordância de correlação de Lin (ρ_c) do ES pela abordagem de determinação da potência cut-off $\geq 0,5$ UI/ mL (ab-OMS) e (2) título de AN em UI/ mL (ab-TAN). Intervalos de confiança 95%. n= 9.	77
Figura 7 - Intervalos de confiança (IC) das potências relativas determinadas nos ensaios NIH e sorológico pelo cut-off $\geq 0,5$ UI/ mL (ab-OMS) e título de AN em UI/ mL (ab-TAN). A vacina C foi excluída devido à alta variabilidade. n = 4	78
Figura 8 - Regressão linear dos logaritmos das médias dos títulos de anticorpos neutralizantes de camundongos (Log AN) contra o do teor de Glicoproteína (Log GLPTN) de lotes de vacina contra raiva frente a referência BR013.	83
Figura 9 - Regressão linear dos logaritmos das médias dos títulos de anticorpos neutralizantes de camundongos (Log AN) contra o do teor de Glicoproteína (Log GLPTN) de lotes de vacina contra raiva frente a referência Pasteur.	83
Figura 10 - Regressão linear dos logaritmos das médias dos títulos de anticorpos neutralizantes (Log Méd AN) de camundongos da vacina BR014 e do teor de Glicoproteína (Log GLPTN) de lotes de vacina contra raiva frente a referência BR013.	84
Figura 11 - Regressão linear dos logaritmos das médias dos títulos de anticorpos neutralizantes (Log Méd AN) de camundongos da vacina BR014 e do teor de	

Glicoproteína (Log GLPTN) de lotes de vacina contra raiva frente a referência Pasteur.....	85
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de soros com neutralização total no RFFITm e projeção dos títulos de anticorpos neutralizantes.	53
Tabela 2 - Série histórica do quantitativo de animais utilizados por lote de vacina analisado e perspectiva da diminuição no ensaio sorológico.	60
Tabela 3 - Avaliação do esquema vacinal do EPNIH.	62
Tabela 4 - Concordância entre as potências relativas no EPNIH entre dois esquemas vacinais contra a potência declarada pelo produtor.	63
Tabela 5 - Títulos de anticorpos neutralizantes contra raiva em UI/mL pelo RFFITm segundo Ensaio sorológico.	65
Tabela 6 - Potências relativas e intervalos de confiança de lotes de vacina obtidos pelos Ensaio sorológico e NIH contra BR014.	68
Tabela 7 - Potência relativa e intervalo de confiança obtidos pelos ensaios de potência sorológico e NIH após tratamento térmico.	69
Tabela 8 - Teste de normalidade Omnibus D'Agostino & Pearson das potências obtidas nas três abordagens do ES e no EPNIH.	70
Tabela 9 - Teste <i>t</i> pareado das potências relativas obtidas nos ensaios sorológico e NIH de cinco lotes de vacinas.	72
Tabela 10 - Sensibilidade, Especificidade, Valores preditivo positivo e negativo e Exatidão do Ensaio sorológico contra o Ensaio NIH.	74
Tabela 11 - Sensibilidade, Especificidade, Valores preditivo positivo e negativo e Exatidão do ensaio sorológico em diluição única da vacina contra o ensaio NIH.	75
Tabela 12 - Coeficientes Cohen Kappa do ensaio sorológico contra o ensaio NIH.	75
Tabela 13 - Coeficientes Cohen Kappa do ensaio sorológico em diluição única contra o ensaio NIH.	76
Tabela 14 - Coeficientes de concordância de Lin do ensaio sorológico contra o EPNIH.	77
Tabela 15 - Coeficientes de variação intraensaio e interensaio do ensaio sorológico.	79
Tabela 16 - Teor de Glicoproteína de vacinas contra raiva frente a duas vacinas de referência e potência nos ensaios NIH e sorológico.	80
Tabela 17 - Teor de Glicoproteína de vacina contra raiva frente ao padrão vacina BR013 e médias dos títulos de anticorpos neutralizantes de camundongos.	81

Tabela 18 - Teor de Glicoproteína de lotes de vacina contra raiva frente a referência Pasteur e médias dos títulos de anticorpos neutralizantes de camundongos.82

LISTA DE SIGLAS

ABLV	<i>Australian Bat Lyssavirus</i>
ab-ACIP	abordagem ACIP - <i>cut-off</i> $\geq 0,12$ UI/ mL
ab-OMS	abordagem OMS - <i>cut-off</i> $\geq 0,5$ UI/ mL como título mínimo de soroconversão
ab-TAN	abordagem título absoluto de AN em UI/ mL
a.C.	antes de Cristo
ACIP	<i>Advisory Committee on Immunization Practices</i>
ANOVA	análise de variância
ANm-D1	anticorpo monoclonal D1 murino
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHK	<i>baby hamster kidney</i>
BraCVAM	Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CEUA	Comissões de Ética no Uso de Animais
CMC	<i>Chemistry, manufacturing and control</i>
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CP	consistência de produção
CQ	Controle da qualidade
CVS	<i>Challenge virus standard</i>
DL ₅₀	Dose letal 50 %
DE ₅₀	Dose efetiva 50%
DFF ₅₀	Dose formadora de focos fluorescentes 50%
DIFF ₅₀	Dose inibidora de focos fluorescentes 50%

EBL	European Bat Lyssavirus
Elisa	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPNIH	Ensaio de potência NIH
ERA	<i>Evelyn Rokitniki Abelseth Virus</i>
ES	Ensaio Sorológico
ES-DU	Ensaio sorológico em diluição única
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
gCV%	Coeficiente geométrico de variação
GLPTN	Glicoproteína
HEP	<i>High Egg Passage</i>
ic	intracerebral
IC	intervalos de confiança
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
IFD	Teste de imunofluorescência direta
IgG	imunoglobulina G
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ip	intraperitoneal
NIBSC	National Institute of Biological Standards and Control
LBV	<i>Lagos Bat Virus</i>
LEP	<i>Flury Low Egg Passage</i>
LVV	Laboratório de Vacinas Virais
NIH	<i>National Institute of Health</i>

OMS	Organização Mundial da Saúde
ρ	coeficiente de Pearson
ρ_c	coeficiente de concordância de correlação de Lin
PM	Pitman-Moore Virus
PNI	Programa Nacional de Imunizações
PNPR	Programa Nacional de Profilaxia da Raiva
POP	procedimento operacional padrão
PV	Pasteur Virus
PVCV	Purified Vero Cell Vaccine
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
RFFIT	Teste de inibição de focos fluorescentes
RFFITm	Teste de inibição de focos fluorescentes modificado
RNA	ácido ribonucleico
RNP	ribonucleoproteína
SAD	<i>Street-Alabama-Dufferin Virus</i>
SN	Soro controle negativo
SR	Soro de Referência Internacional
ST	Soro teste
TECPAR	Instituto Tecnológico do Paraná
VacRab	vacina contra Raiva de uso humano
VacRef	vacina de referência
Vero	células renais de macacos africanos
VISA	Vigilância Sanitária
VPN	Valor preditivo negativo

VPP	Valor preditivo positivo
VR	Lyssavirus da Raiva
VT	vírus trabalho
3R	<i>Reduction, Refinement and Replacement</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Histórico da raiva	23
1.2 Epidemiologia	25
1.3 Vacinas contra raiva no Brasil	27
1.4 Controle da qualidade de imunobiológicos	30
1.4.1 O Laboratório nacional de controle	30
1.4.2 Ensaio de potência <i>National Institute of Health</i> (EPNIH).....	31
1.5 Animais de laboratório	32
1.5.1 Uso de animais de laboratório	32
1.5.2 O princípio dos 3R de Russel & Burch	32
1.5.3 Cenário da experimentação animal no Brasil	33
1.6 Métodos alternativos para imunobiológicos	34
1.7 Consistência de produção	36
1.8 Validação de métodos alternativos	38
1.8.1 Boas práticas de fabricação e validação	38
1.8.2 Principais organismos internacionais de validação de métodos alternativos ...	39
1.9 Processo de validação	40
2 OBJETIVO GERAL	44
2.1 Objetivos específicos	44
3 METODOLOGIA	45
3.1 Vacinas	45
3.1.1 Vacinas teste	45
3.1.2 Vacina de referência (VacRef)	47
3.2 Animais de laboratório	47
3.3 Ensaio de potência de nih (EPNIH)	48
3.3.1 Cepa viral de desafio.....	48
3.3.2 Imunização e desafio.....	48
3.3.3 Avaliação do esquema vacinal	49
3.4 Ensaio sorológico para potência de vacinas contra raiva de uso humano (ES)	49
3.4.1 Titulação de anticorpos pelo teste de inibição de focos fluorescentes modificado	50

3.4.1.1	<i>Cultura de células</i>	50
3.4.1.2	<i>Cepa viral</i>	50
3.4.1.3	<i>Soro de referência internacional (SR)</i>	50
3.4.1.4	<i>Soro controle negativo</i>	51
3.4.1.5	<i>Obtenção de amostras de sangue</i>	51
3.4.1.6	<i>Teste de inibição de focos fluorescentes modificado (RFFITm)</i>	51
3.4.1.7	<i>Teste de imunofluorescência direta (IFD)</i>	52
3.5	Pré-validação do ensaio sorológico para potência de vacinas contra raiva	54
3.5.1	Demonstração da Relevância	54
3.5.2	Avaliação da Confiabilidade do ES	55
3.6	Verificação do limite inferior de imunogenicidade da glicoproteína viral	55
3.6.1	Determinação do teor de glicoproteína g no ensaio imunoenzimático (Elisa - do inglês <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	55
3.7	Análise estatística	57
4	RESULTADOS	59
4.1	Levantamento de amostras de vacinas e estimativa de animais utilizados	59
4.2	Padronização do ensaio sorológico para avaliação da potência de vacinas contra raiva de uso humano e elaboração de procedimento operacional	61
4.2.1	Avaliação do esquema vacinal	61
4.2.2	Elaboração do procedimento operacional padrão do ensaio sorológico	64
4.2.3	Padronização do Ensaio sorológico para potência de vacinas contra raiva de uso humano (ES)	64
4.2.3.1	<i>Titulação de anticorpos pelo RFFITm</i>	64
4.2.3.2	<i>Definição do modelo estatístico para cálculo de resultados</i>	70
4.3	Pré-validação do ensaio sorológico para a determinação da potência de vacinas contra raiva de uso humano	71
4.3.1	Relevância.....	71
4.3.2	Confiabilidade.....	78
4.4	Verificação do limite inferior de imunogenicidade da glicoproteína	79
5	DISCUSSÃO	86
6	CONCLUSÃO	97
	REFERÊNCIAS	98
	ANEXO 1 – LICENÇA LW-17/16 EXPEDIDA PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FIOCRUZ	117

APÊNDICE A – FLUXOGRAMA DOS ENSAIOS DE POTÊNCIA	118
APÊNDICE B – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO - ENSAIO SOROLÓGICO PARA AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE VACINAS CONTRA RAIVA	119
APÊNDICE C – ARTIGO INTITULADO “DEVELOPMENT AND PRE-VALIDATION OF A QUANTITATIVE MULTI-DOSE SEROLOGICAL ASSAY FOR POTENCY TESTING OF INACTIVATED RABIES VACCINES FOR HUMAN USE” - JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS 263 (2019) 54–59	144
APÊNDICE D – ARTIGO INTITULADO “VERIFICATION OF THE RABIES VIRUS GLYCOPROTEIN LOWER LIMIT OF IMMUNOGENICITY BY SEROLOGICAL ASSAY” - JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS 264 (2019) 31–37	150

1 INTRODUÇÃO

A Raiva é uma zoonose transmitida ao homem pela inoculação do Lyssavirus da Raiva (VR), principalmente pela mordedura de animais infectados e, mais raramente, pela arranhadura e lambadura de mucosas e/ou pele lesada. Dentre as doenças infecciosas de origem viral, a Raiva é única em relação a seu alcance e ao número de vítimas, uma vez que pode afetar todos os mamíferos, cursando uma encefalite aguda, capaz de levar as vítimas ao óbito em praticamente 100% dos casos (ACHA, SZYFRES, 2003; CONSALES, BOLZAN, 2007; INTERNATIONAL COMMITTEE, 2011; RUPPRECHT, KUZMIN, MESLIN, 2017).

Embora tenha sido uma das primeiras doenças humanas a ter uma vacina experimentalmente desenvolvida com sucesso em 1885 (VODOPIJA, CLARCK, 1991), dados publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que a Raiva já esteve entre as dez causas mais comuns de mortes humanas no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

O VR pertence à ordem Mononegavirales, família Rhabdoviridae, com pelo menos três gêneros que afetam animais: Lyssavirus, Ephemerovirus e Vesiculovirus. Atribuía-se a Raiva apenas uma espécie de vírus, até que os métodos sorológicos, antigênicos e genéticos demonstraram a existência de pelo menos sete genótipos diferentes (RUPPRECHT, KUZMIN, MESLIN, 2017). Com base em relações filogenéticas e propriedades antigênicas, o gênero foi subdividido em dois filogrupos. O filogrupo I inclui o VR, *Australian Bat Lyssavirus* (ABLV), vírus de Duvenhage (DUVV), *European Bat Lyssavirus 1 e 2* (EBLV1 e 2), vírus Aravan (ARAV), vírus Khujand (KHUV) e Irkut (IRKV), enquanto no filogrupo II encontram-se vírus Lagos de morcego (LBV) e vírus de Mokola (MOKV) (INTERNATIONAL COMMITTEE, 2011). O sorotipo 1, genótipo 1, inclui o vírus rábico clássico, o *street* (selvagem) e as cepas vacinais *Challenge Virus Standard* (CVS), *Pasteur Virus* (PV), *Pitman-Moore Virus* (PM), *Flury Low Egg Passage* e *High Egg Passage* (LEP e HEP), *Evelyn Rokitniki Abelseth Virus* (ERA) e *Street-Alabama-Dufferin Virus* (SAD). Os demais sorotipos são vírus relacionados a Raiva (TORDO, 1996).

O vírus possui a forma de projétil e seu genoma é constituído por fita simples de ácido ribonucléico (RNA), não-segmentada e de polaridade negativa (PRESCOTT, HARLEY, KLEIN, 1996; TORDO, 1996). A partícula viral possui diâmetro de 75 nm (60 a 110 nm) e 180 nm (100 a 300 nm) de comprimento

(HUMMELER, KOPROWSKI, WIKTOR, 1967; VERNON, NEURATH, RUBIN, 1972). As partículas defeituosas não são infecciosas e assemelham-se ao vírus padrão na composição proteica e lipídica. Apresentam a mesma configuração básica, porém, são mais curtas (20% a 50% do comprimento do vírus padrão), e 50% a 80% do genoma podem ser suprimidos (MATTOS, MATTOS, RUPPRECHT, 2001). Morfologicamente, a partícula pode ser dividida em duas unidades estruturais: o nucleocapsídeo de simetria helicoidal – parte central formada por um cilindro denso – e a periférica, um fino envelope de 8 nm de largura coberto com espículas, que envolve o nucleocapsídeo. A massa molecular é de $4,6 \times 10^6$ kDa, a densidade $1,20 \text{ g/cm}^3$ em cloreto de cério (CsCl), $1,19 \text{ g/cm}^3$ em sacarose (KOPROWSKI, 1991; MATTOS, MATTOS, RUPPRECHT, 2001) e com 12 kilobases de tamanho (WHITE, FENNER, 1994).

O genoma codifica cinco proteínas, nucleoproteína (N), polimerase (L), fosfoproteína (P), glicoproteína (GLPTN) e proteína da matriz (M). No complexo ribonucleoproteína (RNP), a molécula de RNA genômico está firmemente associada à nucleoproteína N (SOKOL, STANCEK, KOPROWSKI, 1971). Essa conformação protege o RNA da ação de ribonucleases e parece manter o RNA em uma configuração apropriada para a transcrição (SOKOL et al, 1969). Outras duas proteínas virais estão associadas à RNP, a fosfoproteína e a proteína L. Essa última possui massa molecular relativamente alta e está ligada à molécula de RNA (WUNNER, 1991; TORDO, 1996). Suas funções incluem a síntese, o *capping* (polarização), a metilação e a poliadenilação do RNA (MATTOS, MATTOS, RUPPRECHT, 2001). Pouco se sabe sobre a fosfoproteína e sua associação à estrutura helicoidal da RNP e a natureza do complexo fosfoproteína-nucleoproteína N do vírion, ou como ela interage com a proteína L no complexo ativo da polimerase nas células infectadas (WUNNER, 1991). A GLPTN está presente em duas formas, com diferentes extensões de glicosilação, mas ambas são gorduras aciladas com ácido palmítico (TORDO, 1996). Tal proteína forma projeções de 10 nm de comprimento distando 5 nm entre elas, organizadas em trímeros de proteína GLPTN ancoradas à membrana que envolve a partícula viral. Essa proteína é o antígeno de superfície capaz de induzir a formação e de reagir com os anticorpos neutralizantes (AN) (MATTOS, MATTOS, RUPPRECHT, 2001). Acredita-se que as proteínas M estejam situadas na superfície interna do envelope viral onde interagem com segmentos internos das GLPTN ancoradas na membrana. Assim, ligam as proteínas

associadas à membrana ao nucleocapsídeo, além de exercerem uma função essencial no brotamento do vírus (HUMMELER et al, 1968; WEISS, BENNETT, 1980).

O VR apresenta dois antígenos principais. Um externo (GLPTN) e outro interno (nucleoproteína N) (BRASIL, 2014). O vírus é estável em uma faixa de pH entre 5 e 10 e é inativado por agentes físicos e químicos, como o calor, radiação ultravioleta, raios X, detergentes, agentes oxidantes, etc. (MATTOS, MATTOS, RUPPRECHT, 2001). É sensível a solventes lipídicos, ao álcool etílico de 45% a 70%, às preparações iodadas e ao composto quaternário de amônio (KAPLAN, 1996).

1.1 Histórico da raiva

O VR causa uma das doenças mais antigas e a mais letal de todas as doenças infecciosas. Em 2.300 anos antes de Cristo (a.C.) já era conhecida no Egito (WHITE, FENNER, 1994; COLLIER, OXFORD, 2000). Na era pré-mosaica eram previstas multas para os proprietários de *cães loucos* que agredissem pessoas (MATTOS, MATTOS, RUPPRECHT, 2001). Os gregos chamavam a Raiva de *Lyssa* ou *Lytta*, que significa *loucura*. A palavra *raiva* deriva de *rabere* que significa *raiva* ou *loucura* do Latim (PRESCOTT, HARLEY, KLEIN, 1996) ou *rabhas* (*ser violento*) em Sânscrito antigo (STEELE, FERNANDEZ, 1991). No século I, Cardanus relatou a saliva de cães raivosos como a fonte de infecção e os especialistas romanos da época descreviam o material infeccioso como um veneno (*virus* do Latim) (STEELE, FERNANDEZ, 1991; MATTOS, MATTOS, RUPPRECHT, 2001).

Na Idade Média, doutores sírios acreditavam que a doença era incurável. Rhazes, médico árabe, mencionou a hidrofobia em paciente que tinha ataques com tremores e enrijecimento muscular quando olhava a água (STEELE, FERNANDEZ, 1991). Outro médico árabe, Avicenna, descreveu sinais cutâneos como eritema, designados de roséola rábica ou plêiade rábica e bulbo rábico (FLEMING, 1872).

Na Era Moderna, foi escrito pelo médico italiano Fracastoro, o tratado intitulado “Una ferida incurable”, em 1546 (MATTOS, MATTOS, RUPPRECHT, 2001). A Universidade de Sorbonne condenou as práticas – que considerava supersticiosas – para o tratamento da Raiva em uma declaração em 1671 (STEELE, FERNANDEZ, 1991). Na Era Contemporânea, a partir do séc. XVIII, Zinke (1804)

demonstrou que a doença poderia ser transmitida aplicando, com um pincel, a saliva de um cão com Raiva em incisões feitas em outro cão. Naquela época, ocorreram também avanços no conhecimento da infecção, que incluíam o comprometimento do sistema nervoso, da fonte, da patogênese e do tratamento da Raiva (STEELE, FERNANDEZ, 1991). Em 1824, recomendava-se fazer incisões profundas nas feridas que deviam ser lavadas com água ou ácido clorídrico diluído. Depois que a ferida estivesse limpa e seca, era aplicado um ferro quente ou o ácido clorídrico concentrado (EKSTROM, 1830).

Os estudiosos reconheciam a inoculação de um vírus pela mordedura como a causa da doença, mas consideravam a geração espontânea como a origem do vírus. O pesquisador Reynaud injetou, subcutaneamente, na orelha de um coelho a saliva de um paciente com Raiva. E, quatro dias mais tarde o animal apresentou paralisia e morreu. Estas observações não convenceram a Louis Pasteur, cientista francês, químico e microbiologista, mas são mencionadas como tendo conduzido a seu grande trabalho publicado em 1881 (STEELE, FERNANDEZ, 1991). Mesmo conhecendo os sinais clínicos da Raiva desde a mais remota Antiguidade, somente ao final do século XIX, ocorreram progressos significativos para o diagnóstico, tratamento humano e controle da Raiva animal. Pasteur não conseguiu identificar o vírus, mas acreditava que um microrganismo infinitamente pequeno era a causa da enfermidade, o que foi confirmado décadas após pelos estudos de microscopia eletrônica (ATANASIU et al, 1963; DAVIES et al, 1963; MATSUMOTO, 1963).

A Epizootia de Biguaçu ocorrida em Santa Catarina, entre 1906 a 1908, foi a primeira epizootia de Raiva em herbívoros notificada no Brasil por Parreiras Horta, médico do Instituto Oswaldo Cruz, do Rio de Janeiro (PARREIRAS, FIGUEIREDO, 1911). Carini, médico do Instituto Pasteur de São Paulo, identificou o VR como agente causador da Epizootia de Biguaçu e observou que o número de cães afetados era desproporcional ao de bovinos e equinos. Levantou então a hipótese de a Raiva ser transmitida por morcegos hematófagos aos herbívoros (CARINI, 1911). Alguns anos mais tarde, entre 1914 a 1918, esta suspeita foi confirmada por dois veterinários alemães, contratados pelo governo brasileiro para estudar as mortes dos animais no Sul do país (HAUPT, REHAAG, 1925). Em 1936, Pawan demonstrou, pela primeira vez, seres humanos sendo mordidos por morcegos vampiros e morrendo de Raiva (PAWAN, 1936).

1.2 Epidemiologia

A Raiva apresenta distribuição mundial, exceto na Antártida e está presente em mais de 150 países. Estima-se que anualmente ocorrem 59 mil mortes, 95% delas na Ásia e África, onde mais de três bilhões de pessoas estão em risco de adoecer e morrer, pois vivem em áreas rurais, onde as vacinas e imunoglobulinas não estão prontamente disponíveis ou acessíveis. Cinquenta por cento das agressões por cães raivosos ocorre em crianças com idade inferior a 15 anos. Quinze milhões de pessoas recebem tratamentos pós-exposição por terem algum tipo de contato com animais suspeitos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Os reservatórios variam de acordo com a área geográfica, sendo os cães e os gatos as fontes de maior importância na infecção humana. Os outros reservatórios importantes são os lobos na Europa Oriental, a raposa vermelha na Europa Ocidental, os mangustos e morcegos vampiros no Caribe, cangambás, guaxinins e morcegos nos Estados Unidos da América (EUA) e Canadá e os morcegos vampiros na América Latina (COLLIER, OXFORD, 2000). Os cães são a principal fonte de infecção e é estimada uma média de 100 acidentes notificados com cães suspeitos por 100 mil habitantes ao ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). No Brasil, até o ano de 2003, o ciclo de transmissão predominante responsável pelos casos de Raiva humana era o urbano e o cão contribuiu com a maioria dos casos. Em 2004, o morcego tornou-se o principal transmissor de Raiva humana, devido à ocorrência de dois surtos nos municípios de Portel e Viseu, no Pará, totalizando 15 casos. Essa situação se repetiu no ano seguinte quando foram notificados 32 casos no Pará e no Maranhão, sendo 30 por morcegos, um por cão e um por primata não-humano (OPAS, 2017; BRASIL, 2018).

Ao longo das últimas décadas, os esforços das autoridades de saúde pública determinaram a redução da incidência de Raiva humana e animal nas regiões metropolitanas brasileiras, assim como da maior parte da América Latina. No período de 1980 a julho de 2018, foram notificados 1.455 casos de Raiva humana no Brasil (BRASIL, 2018). Entre 2008 e 2017, foram notificados 30 casos, uma redução de 85% em relação à década anterior. A maioria dos casos está concentrada nas Regiões Norte e Nordeste (OPAS, 2017; BRASIL, 2018). No entanto, a doença ainda é considerada endêmica no país, com prevalência variável de acordo com a

região geopolítica. Há algum tempo, tem sido observado um aumento na detecção de casos de Raiva em morcegos e animais de produção, bem como no número de casos de Raiva humana transmitida por morcegos (MORIKAWA et al, 2012; BRASIL, 2014a).

Entre 2000 e 2009, mais de 425 mil pessoas ao ano procuraram atendimento médico por terem sido expostas ou por se julgarem expostas ao VR e 64% recebeu algum tipo de indicação de tratamento profilático (BRASIL, 2014a). Em 2005, o Ministério da Saúde (MS) gastou cerca de R\$ 66 milhões com as ações de vigilância epidemiológica para Raiva. Esses recursos serviram para medidas como a realização de campanhas de vacinação e a aquisição de imunobiológicos (BRASIL, 2006).

Antes mesmo que a natureza dos vírus fosse compreendida, Louis Pasteur foi estimulado a alcançar uma das grandes descobertas na pesquisa biomédica, abrindo desse modo a era moderna da prevenção das doenças infecciosas pela vacinação (WHITE, FENNER, 1994). Pasteur induziu imunidade em cães usando uma série de injeções do vírus atenuado, descobrindo uma maneira de imunizar também seres humanos. Inoculavam, em cães, fragmentos dessecados por até 15 dias, de medula de coelho inoculado com VR (PASTEUR, 1886). A vacinação é fundamental na prevenção de mortes e no controle da doença em certas populações animais. Nos EUA e outros países desenvolvidos, a vacina contra Raiva efetivamente eliminou cepas de vírus de caninos domésticos (ORGANISATION, 2005).

A profilaxia da Raiva humana pode ser feita por pré ou pós-exposição ao vírus. A profilaxia na pré-exposição compreende a vacinação e é indicada para pessoas que correm o risco contínuo de exposição devido a atividade profissional. A profilaxia de pós-exposição tem indicação quando ocorrem exposições acidentais e deve incluir além da limpeza da lesão, a administração da vacina isoladamente ou associada ao soro ou à imunoglobulina antirrábica humana (BRASIL, 2014a). Os médicos veterinários e os técnicos de laboratório, que têm alto risco de exposição ao VR, devem avaliar o título de anticorpos semestralmente (PRESCOTT, HARLEY, KLEIN, 1996; BRASIL, 2014a). Em caso de suposta exposição, é imprescindível a limpeza do ferimento com água corrente abundante e sabão ou outro detergente, pois essa conduta diminui, comprovadamente, o risco de infecção. Após a limpeza, devem ser utilizados antissépticos que inativem o vírus, como o polivinilpirrolidona-

iodo (PVPI®, Rioquímica), gluconato de clorexidina (Chlorohex®, Johnson) ou álcool iodado (BRASIL, 2014a).

1.3 Vacinas contra raiva no Brasil

A história da luta contra a Raiva no Brasil é antiga. Em fevereiro de 1888, meses antes da inauguração do grande instituto parisiense, D. Pedro II havia fundado o Instituto Pasteur do Rio de Janeiro, ambos nasceram com a finalidade de desenvolver pesquisas e difundir a vacina contra raiva (BENCHIMOL, 1999). Em 1903, foi também fundado em São Paulo, o Instituto Pasteur, como instituição de caráter privado, com objetivos científicos e humanitários (INSTITUTO PASTEUR, 2017).

Porém, a Raiva urbana permaneceu endêmica no Brasil por muito tempo e em 1973, foi criado o Programa Nacional de Profilaxia da Raiva (PNPR), mediante convênio firmado entre os Ministérios da Saúde e da Agricultura, Central de Medicamentos e a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) (BRASIL, 1973).

Todas as vacinas para uso humano contra a Raiva são inativadas. A vacina Fuenzalida & Palácios modificada foi desenvolvida no Chile, na década de 1950 (FUENZALIDA, PALÁCIOS, 1955). Apesar de introduzida no Brasil em 1965, foi escolhida somente a partir deste ano, dentre as várias vacinas até então produzidas no País, como a que melhor atenderia às exigências do PNPR. Era produzida em cérebro de camundongos recém-nascidos, infectados com vírus fixo das cepas PV ou CVS, inativados pela beta-propiolactona. Fabricada pelo Instituto Butantan em São Paulo e pelo Instituto Tecnológico do Paraná (TECPAR), foi a mais utilizada no Brasil até o ano de 2000, quando passou a ser substituída pela vacina produzida em célula Vero. Esta vacina era utilizada em grande escala nas campanhas de vacinação de cães e gatos, e em humanos até 2003, permitindo que a Raiva fosse controlada com êxito na maior parte do País, apesar de toda discussão a respeito de reações adversas causadas por tal classe de vacinas (SILVA, MARKUS, PADILHA, 1967; MARKUS, JOBIM, MOURA, 1971).

Nas décadas seguintes, desenvolveu-se uma vacina a partir de linhagem contínua de células renais de macacos africanos. As células Vero anteriormente foram utilizadas para a produção de vacinas contra a poliomielite (*Purified Vero Cell Vaccine* – PVCV). A vacina é produzida com a cepa Pitman-Moore, inativada pela

beta-propiolactona e concentrada por ultracentrifugação. A potência mínima é de 2,5 UI por dose. As vacinas produzidas em cultura de células de embrião de galinha (*Purified Chick-Embryo Cell Vaccine*) são preparadas com a cepa Flury LEPC25 e desenvolvidas em fibroblastos de embrião do mesmo tipo. São mais seguras e eficazes, eliminando muitos dos problemas com as vacinas produzidas em tecido cerebral (COSTA et al, 2000).

No Brasil, vacinas produzidas em cultura celular ou em embrião de pato estavam disponíveis apenas para pacientes imunodeprimidos e para os que apresentassem eventos adversos graves à vacina Fuenzalida & Palácios modificada. Hoje, as vacinas produzidas em célula Vero estão disponíveis em toda Rede de Saúde Pública (COSTA et al, 2000). Além da imunização, as pessoas em risco devem receber a vacina associada à imunoglobulina, o que reduz substancialmente a mortalidade (WHITE, FENNER, 1994).

O estado de São Paulo iniciou a utilização da vacina purificada produzida em células Vero (VERORAB, Aventis Pasteur, França), a partir do ano 2000. Os demais estados seguiram utilizando a vacina produzida em cérebro de camundongos lactentes produzida pelo TECPAR até 2002. Em 2003, o Instituto Butantan passou a importar e fornecer a vacina purificada em células Vero ao MS, como fruto de um acordo de transferência de tecnologia com a Aventis Pasteur, produtora francesa da vacina.

Quase todas as vacinas são apoiadas nos aspectos funcionais da proteína G, conferindo imunidade contra uma infecção letal. Os anticorpos exercem seu efeito protetor pela neutralização extracelular do vírus, pela lise de células infectadas mediada por complemento e pela citotoxicidade dependente de anticorpos. A ribonucleoproteína também induz uma resposta específica de anticorpos que podem contribuir contra a infecção (MATTOS, MATTOS, RUPPRECHT, 2001). A antigenicidade da GLPTN é conferida por dois sítios antigênicos dominantes (sítios II e III), compostos de 20 aminoácidos de um total de 505, um sítio antigênico menor e poucos epítomos isolados (DIETZSCHOLD et al, 1990; BENMANSOUR et al, 1991).

A intervenção imunológica é eficaz durante o longo período de incubação devido à demora entre a replicação inicial e a entrada do vírus no ambiente protegido do sistema nervoso. Mesmo a imunização de pós-exposição sendo muito eficaz, deve ser feita o mais próximo possível do momento da agressão pelo animal suspeito, uma vez que, se os sinais clínicos surgirem, será demasiado tarde.

Embora as proteínas do VR sejam altamente imunogênicas, nem as respostas mediadas por célula e humoral podem ser detectadas durante a migração do vírus do local da mordida ao Sistema Nervoso Central (WHITE, FENNER, 1994; DIMMOCK, EASTON, LEPPARD, 2001). Duas a quatro semanas após o início do esquema profilático antirrábico, espera-se a produção de anticorpos suficientes para reagir totalmente em uma concentração padrão de VR nos testes de neutralização. A avaliação sorológica deve ser realizada a partir do 10º dia da administração da última dose da vacina e somente títulos iguais ou acima de 0,5 UI/ mL de AN são considerados como satisfatórios (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992). Além disso, pessoas com exposição continuada, como pesquisadores, profissionais de laboratório que manipulam o vírus e os médicos veterinários que atuam em áreas epizooticas, devem ser avaliadas semestralmente. Profissionais com menor risco de exposição devem ser avaliados anualmente. A avaliação sorológica deve ser realizada em todos os pacientes submetidos a vacinação (BRASIL, 2014a).

A partir da década de 1980, houve crescente participação popular e de entidades representativas de diversos segmentos da sociedade no processo político. Isto moldou a concepção vigente de vigilância sanitária, integrando, conforme preceito constitucional, o complexo de atividades concebidas para que o Estado cumprisse o papel de guardião dos direitos do consumidor e provedor das condições de saúde da população (BRASIL, 1990; EDUARDO, 1998). O final desta década e a seguinte foram de grande importância para a estruturação do sistema de saúde brasileiro, assim como para o estabelecimento da Vigilância Sanitária (VISA). Neste período destacou-se como marco de importância a Constituição Federal de 1988, que assegurou o direito e acesso aos serviços de promoção, proteção e recuperação da saúde. Em 1990, a Lei Orgânica da Saúde 8080 definiu a VISA como parte integrante do Sistema Único de Saúde e declarou que o dever do Estado em garantir a saúde, consiste na formulação e execução de políticas econômicas e sociais que visem à redução de riscos de doenças e outros agravos, o estabelecimento de condições que assegurem acesso universal e igualitário às ações e aos serviços para promoção, proteção e recuperação da saúde. Ao final dos anos 1990, a Lei 9782 criou o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Definiu as áreas de atuação da VISA, Meio Ambiente, Circulação de bens e produtos relacionados a saúde, Produção e serviços de saúde, e a Vigilância Sanitária do Trabalho, contribuindo para a

organização do sistema de saúde. Na avaliação da VISA inclui-se o desenvolvimento, a avaliação e o controle de produtos, como os imunobiológicos (BRASIL, 1988a; BRASIL, 1990; BRASIL, 1999).

1.4 Controle da qualidade de imunobiológicos

1.4.1 O Laboratório nacional de controle

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) é uma unidade técnico-científica da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), pertencente ao MS. É o órgão de referência nacional para as questões normativas e analítico-laboratoriais relativas ao controle da qualidade (CQ) de insumos, produtos, ambientes e serviços vinculados à VISA (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2005). Desde 1983, o INCQS faz o CQ dos imunobiológicos (soros e vacinas), utilizados no Programa Nacional de Imunizações (PNI) (MOURA, 2009). Segue o critério de amostragem aleatória para execução de ensaio, onde são analisadas 20% das amostras de produtores que não tenham apresentado lotes reprovados pelo período de três anos (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2015). Em 2008, a ANVISA delegou ao INCQS a responsabilidade de liberação de lotes de vacinas e soros hiperimunes utilizados no Brasil (BRASIL, 2008a).

As vacinas de uso humano utilizadas pelo MS na prevenção da Raiva têm sua potência avaliada lote a lote no INCQS, desde 1987, pelo ensaio *National Institute of Health* (NIH) (SELIGMANN, 1966). As vacinas de cultivo celular devem apresentar potência mínima de 2,5 UI/dose. A produção é baseada no sistema de lote semente de vírus que deve estar devidamente caracterizado. Os lotes são submetidos aos controles de identificação viral, esterilidade e título viral. Além disso, é necessário que a cepa viral demonstre imunogenicidade adequada para o homem. A replicação do vírus é realizada em cultura de célula suscetível e controlada quanto à esterilidade, identidade viral e título viral. No processo de produção, uma suspensão viral intermediária é preparada, purificada e inativada. Após a inativação, o produto é concentrado e são realizados testes de esterilidade, inativação viral e atividade imunogênica. Antes do envase, o produto é submetido, ainda, aos controles de esterilidade, atividade imunogênica e teor de conservantes (quando presentes). Os ensaios preconizados pela Farmacopeia Brasileira são: identificação, ensaios físico-

químicos (fenol, tiomersal e umidade residual), testes de segurança biológica (esterilidade, pirogênio e inativação viral), determinação da atividade imunogênica (potência) e termoestabilidade (FARMACOPEIA, 2010a). Este último é dispensado pelas normas da OMS e Farmacopeia Européia para efeito de liberação de lotes, sendo aplicável apenas durante a produção (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007; COUNCIL, 2015).

1.4.2 Ensaio de potência *National Institute of Health* (EPNIH)

O ensaio de potência avalia a imunogenicidade da vacina contra Raiva de uso humano (VacRab) frente a uma vacina de referência (VacRef) pelo método NIH volumétrico. É aplicado no CQ de lotes de vacina que consistam de preparações contendo vírus rábico fixo inativado. Utiliza como padrões e substâncias biológicas de referência o vírus trabalho (VT), obtido da cepa CVS, e a VacRef contra Raiva com potência padronizada em UI (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2017a).

O primeiro teste de potência em camundongos descrito foi o teste de Habel (HABEL, 1996), que foi progressivamente substituído pelo Ensaio de potência NIH (EPNIH). Este é um método *in vivo* que consiste na imunização intraperitoneal (ip) de grupos de camundongos, seguido por um desafio intracerebral (ic) com vírus padrão (CVS). Os animais são monitorados durante 14 dias pós-desafio e a potência relativa de uma vacina teste é calculada por comparação da sua dose efetiva média ou 50% (DE₅₀) com a DE₅₀ de uma VacRef (WILBUR, AUBERT, 1996).

O EPNIH é realizado em camundongos Swiss de 21 dias de idade, em quantidade que varia de 126 a 270, se forem analisadas uma a quatro vacinas teste. Os animais são distribuídos em grupos: 30 camundongos no controle viral para testar doses do CVS, 48 para as doses da VacRef e 48 de cada vacina teste. O desafio por vírus padrão consiste geralmente de uma suspensão de cérebro de camundongo 20%, fornecendo 10 a 50 dose letal 50 % (DL₅₀)/30µL pela via ic, utilizada também para determinação da DL₅₀ (FARMACOPEIA, 2010a; INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2017a). Para minimizar ou evitar a dor e o sofrimento associado ao procedimento de inoculação intracraniana, os camundongos devem ser anestesiados utilizando anestésicos inalatórios ou injetáveis (HEDRICH, 2004).

O ensaio de potência é um método de titulação com base quantal ou respostas 'tudo ou nada'. Em tais ensaios de diluição, é necessária uma comparação entre a relação de dose/resposta da VacRef e da vacina de teste. A linearização destas curvas de dose/resposta pode ser obtida por diferentes transformações, tais como análise de probitos, transformação angular etc. Potência e os limites de confiança podem ser calculados comparando a DE₅₀ da VacRef com a DE₅₀ da vacina de teste (GOVINDARAJULU, 2001; SERVAT, CLIQUET, 2015).

1.5 Animais de laboratório

1.5.1 Uso de animais de laboratório

Testes em animais têm desempenhado um papel crucial em pesquisa e desenvolvimento e no CQ de vacinas de uso humano, desde os primeiros passos dados para sua criação. Ensaio de CQ de vacinas, *in vivo* assim como *in vitro*, são importantes estágios no estudo das vacinas, durante a pesquisa e desenvolvimento, na rotina e após a produção, e na liberação de lotes. No entanto, com o avançado estágio de desenvolvimento tecnológico, das técnicas de laboratório e da consciência ética, esforços devem ser dirigidos para a racionalização no uso de animais no CQ desses produtos (METZ et al 2002).

Embora a tecnologia tenha avançado muitas das primeiras gerações de vacinas, ainda em produção, utilizam técnicas de inativação/detoxificação ou atenuação de um microrganismo virulento. Devido ao modo como as vacinas tradicionais são produzidas, extensos controles utilizando animais são necessários, e as especificações para CQ estão descritas nas monografias específicas de cada produto (METZ et al, 2002).

1.5.2 O princípio dos 3R de Russel & Burch

Em 1959, o livro *The Principles of Humane Experimental Technique* foi publicado por Russell e Burch (1959). Embora os autores só tenham obtido reconhecimento na década de 1970, serviu como pedra fundamental na experimentação animal, dando origem ao conceito dos 3R (*Reduction, Refinement and Replacement*). Os autores postularam que quando animais eram utilizados em

experimentos, todo esforço deveria ser aplicado para substituí-los com alternativas não-sencientes, com o objetivo de reduzir ao mínimo o número de animais e para limitar experiências que provocassem dor e angústia. Os 3R passaram a ser uma área comum dos investigadores que trabalham com animais e daqueles que se opõem a sua utilização. Mesmo os cientistas que aceitam a necessidade de utilizar animais em alguns experimentos, concordam com a idéia que seria preferível não usar. Se não há alternativa, o menor número possível deve ser utilizado com um mínimo de dor ou sofrimento. Muitos dos opositores da experimentação animal também concordam que, até os animais serem completamente substituídos, os 3R de Russell e Burch fornecem um meio de melhorar o bem-estar animal (RUSSELL, BURCH, 1959; FLECKNELL, 2002).

1.5.3 Cenário da experimentação animal no Brasil

Em 2008, após 12 anos de tramitação, foi promulgada a Lei 11.794 proposta pelo sanitarista Sérgio Arouca. Esta lei regulamentou o inciso VII do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo os procedimentos para o uso científico de animais. No ano seguinte o Decreto 6.899 estabeleceu as normas de funcionamento do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), criou o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei (BRASIL, 1988a; BRASIL, 2008b; BRASIL, 2009).

Em 2016, o CONCEA publicou a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA. A finalidade é de apresentar princípios de condutas que permitissem garantir o cuidado e o manejo ético de animais utilizados para fins científicos ou didáticos. Os princípios estabelecidos nesta diretriz são orientações para pesquisadores, professores, estudantes, técnicos, instituições, Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA) e todos os envolvidos no cuidado e manejo de animais. Em seus princípios gerais, orienta sobre práticas de cuidados que exigem comprometimento real com o bem-estar animal, o respeito pela contribuição que os animais oferecem para a pesquisa e ensino, e também apresenta mecanismos para uma análise ética de seu uso. Este documento ressalta a responsabilidade de todos os envolvidos na criação, no cuidado e na utilização de animais para fins científicos ou didáticos. Prevê ainda que as propostas de utilização de animais para fins científicos ou didáticos devem

considerar a substituição dos animais por métodos alternativos validados (BRASIL, 2016). Na Fiocruz, a CEUA está encarregada de emitir pareceres quanto aos aspectos éticos de todos os procedimentos envolvendo animais, considerando a relevância do propósito científico e o impacto de tais atividades sobre a preservação da vida, o bem-estar e a proteção dos animais (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2016a).

Desde 1985, a busca por métodos alternativos que dispensem o uso de animais em pesquisas laboratoriais tem sido prioridade para o INCQS, culminando com a idealização de um centro de validação de métodos alternativos em 2008 (PAUMGARTTEN et al, 1989; PRESGRAVE, 2008). A partir de uma parceria da instituição com a ANVISA, esse esforço conjunto originou, em janeiro de 2012, um Acordo de Cooperação Técnica, nomeando uma comissão para viabilizar a criação do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), o primeiro da América Latina a validar e coordenar estudos de substituição, redução ou refinamento do emprego de animais de laboratório (BRASIL, 2012a).

A Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) ao uso de animais foi criada pela Portaria 491 do Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação, em 2012. Sua criação vem ao encontro do panorama internacional que fomenta e privilegia o princípio dos 3R, organizando uma infraestrutura laboratorial e de recursos humanos especializados, capazes de implantar métodos alternativos ao uso de animais, assim como desenvolver e validar novos métodos no Brasil. Ficou estabelecido, pela Portaria, que o processo de validação de métodos alternativos dar-se-á no âmbito do BraCVAM. Este órgão tem o papel de identificar métodos alternativos nacionais e internacionais, bem como receber propostas de validação de métodos de laboratórios públicos ou privados, indústrias, universidades etc. Sugerindo, assim, a adaptação à demanda nacional e estimulando a substituição dos métodos em estudos brasileiros (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2016b; BRASIL, 2012b).

1.6 Métodos alternativos para imunobiológicos

A produção de imunobiológicos é um processo complexo que requer controles extremamente rigorosos em todas as etapas. Cerca de 70% do tempo é dedicado ao CQ (SANOFI, 2017). Além disso, os programas de vigilância são necessários para evitar prejuízos a Saúde Pública ou danos econômicos causados por produtos com

monitoramento precário, falsificação etc. Alertas sobre produtos falsificados incluíram vacinas contra influenza, meningite e Raiva (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Entretanto, determinar a eficácia e segurança de VacRab requer a utilização de um grande número de animais de laboratório e lhes inflige significativa dor e sofrimento. Novos métodos e abordagens estão disponíveis, são considerados mais humanitários e utilizam menos ou nenhum animal; são mais rápidos, menos onerosos e mais precisos; e podem ser considerados mais seguros para os analistas. No entanto, o desafio é aplicá-los no CQ e/ou na liberação de lotes de vacina no contexto dos órgãos regulatórios (ORGANISATION, 2005).

Durante muitos anos, tanto o teste de Habel (HABEL, 1996) como o EPNIH (WILBUR; AUBERT, 1996) foram utilizados para analisar a potência da VacRab. O conceito de utilizar a quantidade de anticorpos produzidos em animais imunizados, como um meio para avaliar a potência do agente imunizante, não é novo. Em 1972, um teste sorológico foi proposto como possível substituto para o EPNIH (ARKO, WIKTOR, SIKES, 1973). Nas últimas décadas, vários modelos de quantificação de antígeno e sorológicos foram desenvolvidos como alternativas potenciais para o ensaio de atividade. Exemplo disso é o teste de inibição de focos fluorescentes (RFFIT) (KRÄMER et al, 2009; KRÄMER et al, 2010) para a VacRab inativada de uso veterinário. A Farmacopeia Europeia propõe dois métodos para a determinação da potência dessa mesma vacina, o teste clássico de desafio e, como alternativa e possível método para fins de teste de potência, a titulação de AN induzidos após a vacinação de camundongos, revelado pelo RFFIT (COUNCIL, 2013). Embora este método seja mais rápido e menos doloroso para os animais, ainda não é amplamente utilizado e existem apenas poucos dados sobre a correspondência com o método clássico (FITZGERALD et al, 1978; KRÄMER et al, 2009). No Brasil, o método de desafio em camundongos e de determinação da atividade imunogênica são aplicados para VacRab inativada de uso humano (FARMACOPEIA, 2010a). Para as vacinas veterinárias de vírus inativado, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento indica o Teste de Habel, o EPNIH e o Teste de proteção em cobaias (BRASIL, 1988b).

Modelos de quantificação de antígeno preveem a substituição total de animais e medem a quantidade de antígeno ou imunógeno da vacina. Estes incluem o ensaio de difusão radial simples (FERGUSON, 1996), que é aceito na liberação de lotes de vacinas para uso humano (BRUCKNER et al, 2003), o teste de ligação do

anticorpo (ARKO, WIKTOR, SIKES, 1973) e vários procedimentos *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Elisa) (PERRIN et al, 1990; ROOIJAKKERS et al, 1996; GAMOH et al, 1996). Entre estes, encontra-se um Elisa utilizado pelo Laboratório de Controle Nacional da Agência Nacional de Segurança de Medicamentos e Produtos para Saúde da França (*Agence National de Sécurité du Medicament et des Produits de Santé*), para quantificar a GLPTN viral na VacRab humana sem adjuvante (STOKES et al, 2012). No entanto, ainda existem diversas incertezas científicas para a aplicação de modelos sorológicos ou de quantificação de antígeno que levam a hesitações a respeito da aceitação desses métodos para fins regulatórios (STOKES, KULPA-EDDY, McFARLAND, 2011; SCHIFFELERS et al, 2014).

1.7 Consistência de produção

Para a liberação de lotes de vacinas é desejável uma garantia adicional da segurança e da qualidade dos lotes produzidos, visando fornecer ao público confiança na utilização dos imunobiológicos. Várias interpretações são aplicadas e reconhece-se que o processo de liberação dos lotes não é a única abordagem para monitorar a qualidade das vacinas. Inspeções de Boas Práticas de Fabricação (BPF), vigilância pós-comercialização e revisões anuais de dados relatados são essenciais para o processo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). Outra maneira de avançar em testes de liberação de lotes é a abordagem de consistência de produção (CP) (METZ et al, 2002).

Embora a CP seja um conceito antigo que visa garantir a liberação ininterrupta de produtos eficazes e seguros, e estava previsto no *The Viruses, Serums Act* (UNITED STATES, D., 1913), somente no início da década dos anos 2000 foi proposta como uma mudança de paradigma, com a abordagem da CP, com um novo conceito de CQ para vacinas. Esta abordagem pode levar a uma redução no uso de animais, desde que um pequeno conjunto de bioensaios executados por lote final, com limitado poder de prever o comportamento da vacina em uma população alvo, seja substituído por uma bateria de ensaios significativos com capacidade ampliada (HENDRIKSEN, 2006).

O modelo de abordagem de consistência para liberação de lotes de vacinas tem como objetivos: (1) identificar os indicadores críticos de segurança e eficácia; (2) fazer uso de procedimentos de CQ em todo o processo de fabrico para identificar

quando há alterações inaceitáveis em parâmetros críticos do produto; (3) incentivar a aplicação de conceitos mais recentes para a garantia de qualidade da vacina, como qualidade do projeto (*quality by design*) e tecnologia analítica de processo. Uma abordagem de consistência bem-sucedida para a determinação da potência e segurança da VacRab exige vários ensaios em processo (STOKES et al, 2012). A CP pode ser descrita em termos de capacidade de processo ou pela capacidade de um processo produzir dentro de certos limites de especificação. Por exemplo, um simples teste de diluição poderia demonstrar se a vacina se encontra na especificação determinada (KREEFTENBERG, 2002). Os novos modelos vão desde modificações do procedimento de teste *in vivo* existente - como o uso de *end point* humanitário (eutanásia antes que o animal não consiga mais se locomover) ou sorologia em vez de desafio - a testes *in vitro* para quantificação de antígeno. Nesta abordagem, o CQ implica na utilização de um conjunto de parâmetros para constituir um perfil do produto, o que é monitorado durante a produção e garante que cada lote é semelhante a uma vacina específica do fabricante de comprovada eficácia clínica e segurança. A consistência depende inteiramente de implementar sistema da qualidade, tais como BPF e garantia da qualidade, e também da utilização de ferramentas de análise do produto (HENDRIKSEN, 2009).

Uma melhor condução na CP por meio de testes durante o processamento, tem permitido simplificação da liberação de protocolos. Em particular, relacionado ao uso de testes *in vitro*, enquanto mantendo a capacidade de demonstrar equivalência com lotes clínicos (JONES, CURRIE, 1991). Os testes de imunogenicidade já são aplicados para vacinas veterinárias, como alternativa ao teste de desafio, com imunização seguida de titulação de AN (KRÄMER et al, 2009; KRÄMER et al, 2010; COUNCIL, 2013). Em ensaios clínicos de novas vacinas desenvolvidas, a OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007) recomenda, para a avaliação clínica de vacinação antirrábica e obtenção de licenciamento, a evidência de apresentar potência mínima de 2,5 UI por dose, induzindo imunogenicidade e proteção adequadas. Uma concentração de anticorpos de, pelo menos, 0,5 UI/ mL nos dias 14 e 28 ou 30, após o início da vacinação, é geralmente considerada como sendo apropriada. Por conseguinte, uma concentração satisfatória de AN pode ser utilizada como um preditor de eficácia clínica deste produto.

Não existe um modelo animal ideal para demonstrar a eficácia de VacRab administradas após a exposição. Na ausência deste modelo, testes laboratoriais

baseados em imunização pré-exposição vêm sendo utilizados. Normalmente, todos os testes de pré-exposição utilizam camundongos. Além disto, este requerimento é baseado na antiga abordagem que considera cada lote de produto biológico como sendo único e, portanto, devendo ser submetido a ensaios que comprovem sua segurança e eficácia. (VODOPIJA, CLARCK, 1991).

1.8 Validação de métodos alternativos

A validação é um estudo pelo qual a confiabilidade e a relevância de um método ou processo são estabelecidas para uma finalidade específica (ORGANISATION, 2005). Consiste em demonstrar experimentalmente que o ensaio é adequado para o fim a que se destina (INTERNATIONAL CONFERENCE, 2005a). Em ensaios de potência para vacinas, é tipicamente baseada: (1) no tipo de vacina testado; (2) nos detalhes específicos dos procedimentos analíticos, nos quais a potência pode significar o teor de antígenos ou, mais tipicamente, a atividade biológica. Os métodos disponíveis incluem ensaios baseados em animais, cultura de células, bioquímica e, em alguns casos, ligação de ligandos a receptores (INTERNATIONAL CONFERENCE, 2005a; METZ et al, 2002).

Abordagens similares têm sido aplicadas às vacinas no mercado, principalmente, nas que são purificadas e parecem estar no escopo da diretriz Q6B (INTERNATIONAL CONFERENCE, 1999), enquanto as vacinas constituídas por proteínas ou peptídeos bem caracterizados são explicitamente incluídas na diretriz Q5C (INTERNATIONAL CONFERENCE, 1995).

1.8.1 Boas práticas de fabricação e validação

A indústria Farmacêutica é altamente regulada. Antes da aprovação de uma nova droga é garantido por agências reguladoras como o *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA e a *European Medicines Agency*, que o produto é seguro e eficaz (PELTZMAN, 1973). Para isto, um grande conjunto de dados de testes clínicos, não clínicos e analíticos químicos, de fabricação e controle (*Chemistry, manufacturing and control* - CMC) são gerados em apoio à aprovação pré-mercado. Além do mais, regulamentos de fabricação, como as BPF correntes dos EUA, também estipulam que padrões modernos sejam adotados no desenho,

monitoramento e controle de processos de fabricação, assim como das instalações, para garantir fornecimento consistente de produtos com alta qualidade aos pacientes (YANG, 2016).

O início da utilização dos padrões modernos para BPF pode ser atribuído a um incidente que começou em dezembro de 1940, quando a *Winthrop Chemical Company* de Nova York colocou no mercado comprimidos de sulfatiazole contaminados com fenobarbital, causando a morte de 300 pessoas (SWANN, 1999). Mas apenas em 1963, após a tragédia da talidomida, foram publicadas as Boas práticas para fabricação, processamento, embalagem ou manipulação de produtos farmacêuticos terminados (UNITED STATES, A., 1963).

O FDA desenvolveu uma revisão baseada em análise de risco, adequação e política de inspeções de forma que as revisões de CMC fossem focadas em questões de alto risco. A iniciativa foi guiada por uma visão para atingir um estado desejado da indústria farmacêutica como o mais eficiente, ágil, flexível setor de fabricação, que confiavelmente produz medicamentos de alta qualidade sem exagero regulatório (WOODCOCK, 2012). Trouxe várias mudanças regulatórias, as mais notórias foram as publicações de documentos guias pelo *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) [ICH Q8 (R2), 8, 9 e 10] relacionados ao desenvolvimento farmacêutico, gerenciamento de risco na qualidade e sistema da qualidade farmacêutico (INTERNATIONAL CONFERENCE 2005b, 2008 e 2009). Estes guias evidenciam a importância do desenvolvimento de processos produtivos baseados no entendimento sistemático, controle de riscos e utilização de sistemas da qualidade dos processos e produtos. Eles representam uma significativa mudança da tradicional 'testagem de conformidade' para a 'qualidade por *design*'.

Outros guias estabelecem os requisitos para verificar o cumprimento das BPF, podendo adotar ações alternativas, desde que validadas. Os estudos de validação são uma parte essencial das BPF e devem ser conduzidos de acordo com protocolos pré-definidos e aprovados (FARMACOPEIA, 2010a).

1.8.2 Principais organismos internacionais de validação de métodos alternativos

Os principais organismos envolvidos em processos de validação incluem o Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos

Farmacêuticos de Uso Humano – ICH, a Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (*Organisation for Economic Co-operation and Development*), o Laboratório de Referência da União Europeia para métodos alternativos em ensaios animais – Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos (*European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing – European Center for the Validation of Alternative Methods*), o Diretório Europeu da Qualidade dos Medicamentos e Cuidados de Saúde (*European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care*), o Comitê de Coordenação Interagencial para Validação de Métodos Alternativos (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, EUA*), Centro Japonês para Validação de Métodos Alternativos (*Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*), o *Johns Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing*, nos EUA e no Brasil, o BraCVAM, criado pela Fundação Oswaldo Cruz em parceria com a ANVISA, ligado ao CONCEA e RENAMA.

Existem também instituições voltadas ao custeio da pesquisa e adoção de métodos alternativos como o Grupo Europeu para Abordagens Alternativas aos Ensaios com Animais (*European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing, União Europeia*), o Fundo para Substituição de Animais em Experimentos Médicos (*Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments, Reino Unido*), a Fundação Doerenkamp-Zbinden para Pesquisa Sem Animais (*Doerenkamp-Zbinden Foundation for Animal-Free Research, Alemanha*), a Plataforma de Consenso Europeu para as Alternativas (*European Consensus Platform for Alternatives*) e o Centro de Conhecimento Holandês em Alternativas ao Uso de Animais (*Netherlands Knowledge Centre on Alternatives to Animal Use*).

1.9 Processo de validação

A validação deve ser considerada quando se desenvolve ou modifica metodologias validadas. A literatura dispõe de vários estudos que relatam a validação de métodos para determinação da potência (HENDRIKSEN, 1995; de KAPPELLE, et.al., 1997; van der ARK et. al., 2000; KRÄMER et. al., 2013), descreve as abordagens para o projeto de validação, critérios de aceitação, análise e interpretação dos dados e, até mesmo, o monitoramento do desempenho pelo CQ (BRASIL, 2003; ORGANISATION, 2005; INTERNATIONAL CONFERENCE, 2005a;

FOOD AND DRUG, 2015; COUNCIL, 2016; UNITED THE UNITED, 2017a,b,c,d; STATES, D., 2017). O ICH Q2 (R1) é considerado a referência primária para recomendações e definições sobre características de validação de procedimentos analíticos para produtos farmacêuticos de uso humano. Tipicamente, são avaliados exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e intervalo (INTERNATIONAL CONFERENCE, 2005a).

Na legislação brasileira, a validação de métodos alternativos envolve os estágios de desenvolvimento, pré-validação, validação e revisão por especialistas, em conformidade com os procedimentos realizados por Centros para Validação de Métodos Alternativos ou por estudos colaborativos internacionais. O método é considerado validado quando a confiabilidade e relevância para certo propósito foram determinadas (BRASIL, 2014b).

As fases até a adoção do ensaio iniciam com a pré-validação que consiste de uma avaliação inicial, visando o ajuste, otimização e padronização do protocolo e dos procedimentos operacionais. Nesta fase, são obtidos dados preliminares de confiabilidade e relevância que irão justificar o estudo de validação formal ou a validação propriamente dita. O processo de validação é composto de duas fases que podem ser divididas em três etapas (ORGANISATION, 2005). No Quadro 1 observam-se as fases da validação e etapas do desenvolvimento de ensaios.

No desenho do estudo, os procedimentos do ensaio candidato são descritos de forma a permitir que se reproduzam as condições necessárias e se obtenha resultados dentro dos critérios de aceitação propostos. As informações essenciais na descrição incluem o princípio do teste, tipo de amostra, equipamentos e padrões utilizados no método (FOOD AND DRUG, 2015).

A pré-validação compreende a comparação do ensaio candidato com o tradicional, para posteriormente avaliar sua transferibilidade. Consiste em demonstrar a confiabilidade pela precisão do ensaio, calculada por meio da variabilidade interensaios (precisão intra e entre ensaios). Para demonstrar a relevância, as amostras são analisadas, comparando os resultados entre os ensaios em animais e o alternativo, a sensibilidade ou concordância e, principalmente, a capacidade para diferenciar lotes potentes de subpotentes, o que determina se o método pode ser considerado relevante (ORGANISATION, 2005).

Na implementação do ensaio, são discutidas as informações sobre os fundamentos científicos, o desenvolvimento e o processo de validação. A execução prática do ensaio enfatiza as instruções sobre os protocolos e a interpretação dos dados. Neste momento, a indústria e as agências reguladoras aceleram a execução e aceitação global. Além disso, verificam a utilidade e as limitações do novo método. Para a avaliação preliminar da transferibilidade, devem ser identificados os pontos críticos no desenvolvimento do ensaio candidato (ORGANISATION, 2005).

Quadro 1 - Fases da validação e etapas do desenvolvimento de ensaios de potência

Partes	Fases	Etapas do desenvolvimento	Especificação
I	Pré-validação	Desenho	Definição das características do ensaio. Descrição e fundamentação da proposta de validação - Fundamentação regulatória
		Desenvolvimento e Refinamento	Confiabilidade - Precisão (variação intra e interlaboratorial, repetibilidade e reprodutibilidade) Relevância (Exatidão - Sensibilidade e Especificidade) - avaliação do desempenho
II	Validação	Qualificação do ensaio	Determinar Confiabilidade e Relevância Considerações sobre bem-estar animal (Redução, Refinamento e Substituição) Considerações práticas (avaliação crítica dos pontos fortes e limitações do ensaio) Considerações sobre Qualidade (processo de implantação do ensaio)

Fonte: (Adaptado de ORGANISATION, 2005 e BIOLOGICAL STANDARDISATION PROGRAMME, 2018).

O desenvolvimento do Ensaio sorológico (ES) para a avaliação da potência de VacRab trará uma importante contribuição para os elevados padrões de eficácia, qualidade e segurança exigidos para os produtos biológicos utilizados no Brasil e em

todo o mundo na prevenção e no diagnóstico da Raiva. Possui ainda aplicações importantes na padronização de materiais de referência e diagnósticos, com implicações na Saúde Pública e na Vigilância Sanitária. A proposta desta pesquisa é aplicar, na prática, o conceito dos 3R no ensaio de potência de NIH, o único aceito para a liberação de lotes de VacRab de uso humano.

2 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um Ensaio Sorológico para a determinação da potência de Vacinas Contra Raiva de Uso Humano em consonância com os princípios dos 3R.

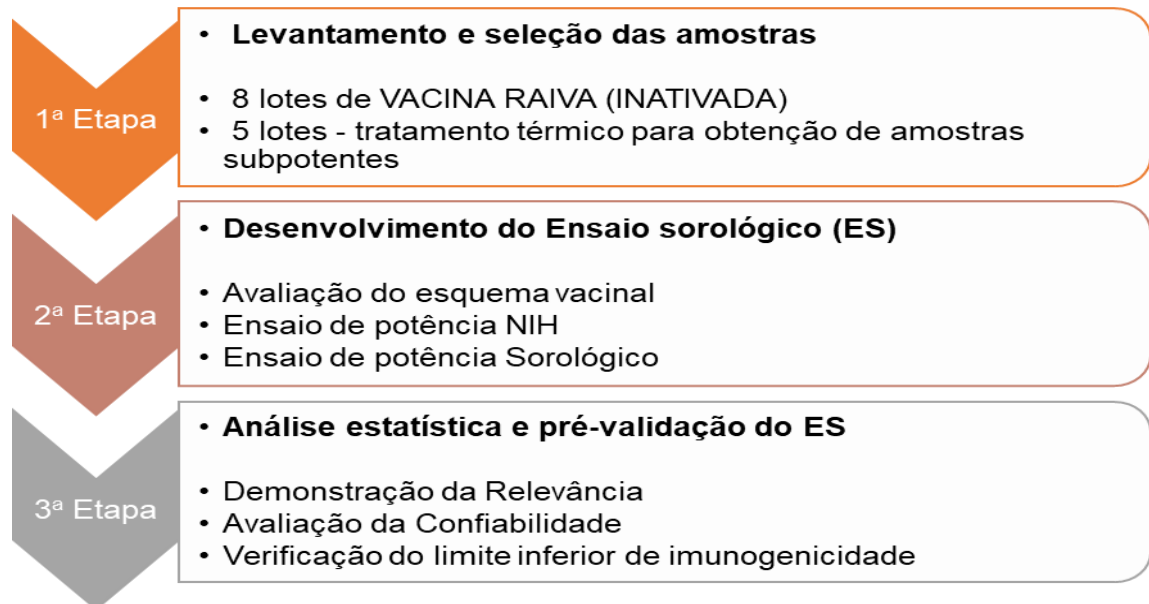
2.1 Objetivos específicos

- a) Realizar um levantamento de amostras de vacinas e a estimativa de animais de laboratório utilizados no controle oficial no período de 2000 a 2017 no INCQS e perspectivas da diminuição no Ensaio sorológico.
- b) Padronizar o ensaio sorológico para avaliação da potência de vacinas contra Raiva de uso humano, elaborando um Procedimento Operacional Padrão do Ensaio;
- c) Pré-validar o ensaio sorológico para a determinação da potência de vacinas contra Raiva de uso humano, demonstrando a sua Relevância e a Confiabilidade;
- d) Avaliar o menor teor de Glicoproteína G viral capaz de induzir uma resposta adequada de anticorpos neutralizantes em camundongos;
- e) Avaliar a correlação do menor teor de Glicoproteína em vacinas contra Raiva com o título de anticorpos neutralizantes produzidos em camundongos.

3 METODOLOGIA

A execução da tese foi dividida em três etapas. Na primeira, foram realizados o levantamento e a seleção das amostras de vacinas. A segunda etapa compreendeu o desenvolvimento do ES para a determinação da potência de VacRab de uso humano e sua comparação com o EPNIH (Apêndice A). Na terceira etapa, foi procedida a análise estatística e a pré-validação do ES. Finalizando com a verificação do limite inferior de imunogenicidade da GLPTN viral no ES (Fig. 1).

Figura 1 - Fluxograma da sistematização da metodologia de pré-validação do Ensaio Sorológico.



Fonte: Do autor, 2018.

3.1 Vacinas

3.1.1 Vacinas teste

Foi realizado um levantamento dos lotes de VacRab recebidos para controle oficial no Laboratório de Vacinas Virais – Raiva (LVV) do Departamento de Imunologia (DI) do INCQS/FIOCRUZ, no período de 2000 a 2017.

A vacina raiva (inativada) utilizada neste estudo é indicada na prevenção da raiva para uso adulto e pediátrico. O produto é apresentado em cartuchos contendo

uma dose em um frasco de pó liofilizado e uma seringa com 0,5 mL de diluente ou cartucho contendo cinco frascos de uma dose e cinco ampolas com 0,5 mL de diluente para suspensão injetável. É produzida em células Vero – PVCV, utilizando a cepa Wistar PM/WI38 1503-3M de vírus da Raiva, inativado pela betapropriolactona. A potência mínima requerida é de 2,5 UI/ dose mensurada pelo teste NIH em camundongos (Sanofi Pasteur SA - França/ Instituto Butantan – Brasil) (SANOFI, 2018).

Foram selecionados oito lotes que haviam sido aprovados na rotina laboratorial entre 2015 e 2017, a fim de se obter amostras dentro do prazo de validade do produto para a realização dos experimentos. As vacinas foram codificadas com as letras de A a H. Após a reconstituição e descanso por cinco minutos, à temperatura ambiente, cinco lotes (A, B, D, E e H) foram submetidos a tratamento térmico $52^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $48\text{h} \pm 10\text{ min}$ para obtenção de vacinas subpotentes.

A fim de reduzir o número de animais utilizados, em três lotes foram considerados os resultados do EPNIH do produtor. Os cinco lotes subpotentes foram submetidos ao EPNIH no INCQS (Quadro 2).

Quadro 2 - Amostras de Vacinas Contra Raiva analisadas por ensaio.

Amostra	Fabricante	Análise Protocolo	Potência (UI/ dose)	
			INCQS	Fabricante
Vac A*			15,0	4,2
Vac B*			19,0	14,4
Vac C			8,0	4,8
Vac D*	Sanofi Pasteur S.A.	Conforme	<i>nr</i>	8,7
Vac E*			<i>nr</i>	6,8
Vac F			>2,5	17,6
Vac G			<i>nr</i>	4,4
Vac H*	Aventis Pasteur S.A.		12,3	15,0

nr – não realizado. *Lotes selecionados para obtenção de vacinas subpotentes.

Fonte: Do autor, 2018.

3.1.2 Vacina de referência (VacRef)

A Referência Nacional de Vacina contra Raiva lote BR014 (VacRef) é o mesmo produto das vacinas teste, com a mesma cepa do vírus da raiva, e foi fabricada em outubro de 2009 pela Sanofi Pasteur S.A. (França). A vacina de cultivo celular é apresentada em frascos uni-dose, produzida em células Vero utilizando a cepa Pitman Moore de vírus da Raiva inativado pela betapropriolactona e liofilizado. Certificada segundo OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006), pela Fiocruz/INCQS, frente ao 6º padrão internacional fornecido pelo *National Institute of Biological Standards and Control* (NIBSC, UK). O título de 9,0 UI por frasco foi atribuído a esta VacRef (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DA QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

3.2 Animais de laboratório

Foram utilizados camundongos da linhagem não consanguínea *Swiss Webster*, machos e fêmeas, com idade de três a quatro semanas, pesando 10 a 15g, provenientes do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB)/Fiocruz. Os animais foram separados por gênero, alojados em gaiolas apropriadas com água e ração *ad libitum*, mantidos sob temperatura e umidade controladas ($22 \pm 1^\circ \text{C}$, cerca de 50% de umidade relativa e fotoperíodo 12:12 h), no Serviço de Animais de Laboratório do Departamento de Farmacologia e Toxicologia do INCQS.

No ES, as amostras de vacina foram testadas em três diluições, cada uma delas aplicada a um grupo de cinco animais diferentes dos utilizados no NIH. No EPNIH, as mesmas amostras foram testadas também com três diluições, em grupo de oito animais em duplicata, totalizando 16 animais por diluição. Trinta camundongos foram divididos em três grupos de 10 animais para a titulação de vírus trabalho no EPNIH.

Na comparação da imunogenicidade pelo ES com o teor de GLPTN, foram realizados três ensaios adicionais com três grupos de 10 animais que foram submetidos a três tratamentos diferentes com um mesmo lote de vacina. Os resultados foram reunidos aos demais e, então, comparados com os obtidos no ensaio de Elisa para o teor de GLPTN viral.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ, licença LW-17/16 (ANEXO 1).

3.3 Ensaio de potência de NIH (EPNIH)

Os lotes selecionados foram testados pelo EPNIH como descrito na Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA, 2010a).

3.3.1 Cepa viral de desafio

A cepa CVS-31 (*Challenge Virus Standard*) foi obtida no LVV - Raiva/DI-FIOCRUZ, vírus da Raiva fixo semente nacional, CVS 31/3#2, lote BR010, origem *Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis* (Buenos Aires/Argentina). As ampolas de suspensão viral liofilizadas a 20%, foram mantidas a $-70^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{ C}$, contendo DL_{50} de 10^7 em 0,03 mL por via ic em camundongos, padrão estabelecido em 10 de agosto de 2004. O vírus semente foi utilizado para a produção do lote trabalho VT15, produzido a partir de cérebro de camundongos. A suspensão de cérebro a 20% foi separada em alíquotas de 500 μL e os criotubos mantidos a $-70^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{ C}$, contendo DL_{50} de $10^{6,7}$ em 0,03 mL por via ic em camundongos, padrão estabelecido em outubro de 2014 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DA QUALIDADE EM SAÚDE, 2017b).

3.3.2 Imunização e desafio

Os camundongos foram imunizados com uma das três diluições seriadas (fator $q=5$) das vacinas teste (1/25, 1/125 e 1/625) ou de referência (1/50, 1/250 e 1/1250), pela via ip com 0,5 mL de vacina nos dias 0 e 7.

No 14^o dia foi realizado o desafio com 32 DL_{50} em 0,03 mL, ic. Os animais foram anestesiados com uma associação de cetamina (150 mg/ Kg) com xilazina (10 mg/ Kg). Paralelamente, foram inoculados com a diluição de vírus de desafio e mais duas diluições decimais realizadas a partir desta nos subgrupos de 10 animais. Estes grupos possibilitam o cálculo da DL_{50} do vírus trabalho e a verificação deste critério de aceitação do ensaio. Os animais foram observados por 14 dias e quando desenvolveram sinais clínicos de Raiva foram submetidos à eutanásia com

pentobarbital após anestesia com a associação de cetamina com xilazina (assim como os sobreviventes ao final da prova). Registrou-se o número de mortos e sobreviventes para o cálculo das DE_{50} das vacinas teste e de referência, assim como da DL_{50} do vírus de desafio (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DA QUALIDADE EM SAÚDE, 2017a). Os resultados do EPNIH obtidos na rotina de controle de vacinas no INCQS e pelo laboratório produtor, foram aproveitados sempre que possível.

3.3.3 Avaliação do esquema vacinal

O esquema vacinal utilizado no ensaio tradicional (EPNIH) foi avaliado a fim de verificar a possibilidade de melhoria no ES. Foi realizado um experimento com quatro vacinas por ensaio (VacRef e três vacinas teste), totalizando três lotes avaliados com uma e duas doses (Vacinas A, B e C). Cada grupo de animais foi imunizado com uma das três diluições seriadas (fator $q=5$) das vacinas teste (1/25, 1/125 e 1/625) ou VacRef (1/50, 1/250 e 1/1250). As imunizações por via ip com 0,5 mL de vacina foram realizadas nos dias 0 (grupos de uma dose) e 0 e 7 (grupos de duas doses). No dia 14 após a imunização, foi procedido o desafio ic e demais passos do EPNIH conforme descrito no item 3.3.2.

3.4 Ensaio sorológico para potência de vacinas contra raiva de uso humano (ES)

No ES para determinação da potência de VacRab de uso humano, os soros foram titulados pelo Teste de inibição de focos fluorescentes modificado para microplaca de 96 poços (RFFITm), comparando os valores das unidades de diluições equivalentes das vacinas teste e de referência, com a potência relativa determinada no EPNIH. Também foi desenvolvido o protocolo do ES, editado em formato de procedimento operacional padrão (POP), com a descrição dos procedimentos aplicados ao CQ de amostras de lotes de VacRab que consistam de preparações contendo vírus da raiva fixo inativado. Os animais vacinados e sangrados no ES foram de grupos diferentes daqueles utilizados no EPNIH.

3.4.1 Titulação de anticorpos pelo teste de inibição de focos fluorescentes modificado

Para a determinação *in vitro* do título de AN contra Raiva, os soros foram avaliados pelo RFFITm como descrito por MOURA e colaboradores (2008).

3.4.1.1 *Cultura de células*

Utilizou-se células BHK-21 clone 13 [C-13] de linhagem certificada (CCL – *certified cell line* - 10) de rim de hamster neonato (*baby hamster kidney*), obtidas da coleção americana de culturas e depósitos (ATCC - Manassas, EUA). As células foram mantidas, em sistema de lote semente, pelo Setor de Cultura de Células do LVV – Células/ DI-FIOCRUZ, estocadas em criotubos de 2,0 mL, conservadas por criopreservação em nitrogênio líquido (-196° C). No momento da utilização, as células foram descongeladas a 37° C e cultivadas em garrafas de poliestireno de 25 cm² ou 75 cm², em meio essencial mínimo de Dulbecco, suplementado com penicilina 50 UI/ mL e estreptomicina 0,05 mg/ mL, anfotericina B 0,42 mg/ L, glutamina 0,3 mg/ mL e 10% de soro fetal bovino. Após o descongelamento, as células foram utilizadas por até 30 passagens.

3.4.1.2 *Cepa viral*

A cepa CVS-11 de vírus da Raiva fixo utilizada no RFFITm foi obtida do LVV – Raiva/DI, lote VT05 (CVS-11; origem ATCC VR 959), doada pelo Instituto Butantan (São Paulo). Mantida criopreservada a -70° ±1° C, contendo suspensão viral com dose infecciosa para cultura de células 50% de 10⁴/ 0,05 mL, estabelecido em julho de 2017 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DA QUALIDADE EM SAÚDE, 2017b).

3.4.1.3 *Soro de referência internacional (SR)*

Foi empregada a imunoglobulina antirrábica humana, 2° padrão de referência internacional (*2nd International WHO Standard - antirabies immunoglobulin, human*). A preparação liofilizada de imunoglobulina contém 30 UI de anticorpos contra o vírus

da raiva por ampola (NIBSC, Potters Bar, Hertfordshire, Reino Unido). Uma ampola foi reconstituída a 2 UI/ mL e a partir desta diluição, o conteúdo foi diluído até 1/4 para ser distribuído em alíquotas de 270 μ L, mantidas a $-70^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C.

3.4.1.4 Soro controle negativo

O soro controle negativo (SN) foi obtido a partir de camundongos não vacinados.

3.4.1.5 Obtenção de amostras de sangue

No dia 14 após a imunização, amostras de sangue foram retiradas sob anestesia com uma associação de cetamina (150 mg/ Kg) e xilazina (10 mg/ Kg) ip (MASSONE, 2011). A sangria foi realizada por punção cardíaca e após a retração do coágulo, mantendo-se entre 4° e 8° C *over night*, o soro foi obtido centrifugando a 200 g por 15 ± 1 minuto. Depois de separados, os soros foram inativados a $56 \pm 1^{\circ}$ C por 30 ± 1 minuto e mantidos a temperatura de $-20 \pm 1^{\circ}$ C até serem testados individualmente para a determinação dos títulos de AN pelo RFFITm.

3.4.1.6 Teste de inibição de focos fluorescentes modificado (RFFITm)

Foram utilizadas microplacas de fundo plano de 96 poços para cultivo celular (Falcon, 353072). O SR, pré-diluído a 1,0 UI/ mL, foi serialmente diluído em triplicatas, fator $q=2$ e testado de 1/16 até 1/128. Os soros teste (ST) foram distribuídos e diluídos fator $q=2$, sendo titulados nas diluições de 1/4 a 1/32 nas placas, em duplicata. A suspensão de VT diluída para conter 200 doses formadoras de focos fluorescentes 50% (DFF₅₀) iniciais foi distribuída nos poços de SR, SN, ST e de controle de vírus. Este último foi serialmente diluído fator $q=10$, distribuído em triplicatas e testado nas diluições de 10^{-2} a 10^{-5} . Dois poços foram utilizados para o controle negativo e, outros dois, para o controle de células (Quadro 3).

Quadro 3 - Esquema de diluições do Soro Referência, soros teste, soro controle negativo e suspensão viral.

Produto	Potência (UI/ mL)	Diluições		Réplicas
		Primeira	Última	
Soro de Referência	1,0	1/16	1/128	3
Soros Teste	?	1/4	1/32	2
Soro controle negativo	0,0	1/4	1/8	2
Suspensão Viral	200 DFF ₅₀ **	10 ⁻²	10 ⁻⁵	3

*Desconhecida. **Dose formadora de focos fluorescentes 50%.

Fonte: Do autor, 2018.

As placas foram incubadas a $36,5^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ C em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO₂ por 90 minutos. Após esse tempo, 100 µL da suspensão de células BHK-21 foi adicionada, ajustada para a concentração de $3,5 \times 10^5$ células/mL, e as placas novamente incubadas a $36,5^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ C por 22 horas.

3.4.1.7 Teste de imunofluorescência direta (IFD)

Após a incubação, foi realizado o IFD em microscópio invertido de imunofluorescência Nikon Eclipse TS100, com objetiva 20x fluorita LWD 20x/0,40 Ph1 ADL $\infty/1,2$ WD 3,1 e, quando foi necessário, objetiva de 40x LWD 40x/0,55 $\infty/1,2$ WD2,1. Foi empregado um conjugado comercial (*Liquid Rabies Antinucleocapsid Conjugate* – Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, França). A monocamada de células foi previamente fixada em acetona gelada diluída a 80% com água destilada (v/v), por 15 minutos e as placas secas ao ar. Em cada poço foram então adicionados 40 µL de conjugado na diluição trabalho (1/20), as placas incubadas a $36,5 \pm 0,5^{\circ}$ C por 30 ± 1 minuto. Após a lavagem com PBS pH 8,1, foi realizado o exame ao microscópio, magnitude de aumento de 200x.

Na leitura das placas, foram contados oito campos por poço anotando, os resultados expressos em número de campos positivos por campos lidos (score). O título de AN dos ST foi calculado ao final da prova pelo método dos probitos e

expresso em UI/ mL. No ST, onde não foi alcançada a neutralização total, foi utilizada uma projeção¹ do título de AN como descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação de soros com neutralização total no RFFITm e projeção dos títulos de anticorpos neutralizantes.

Última diluição	Campos fluorescentes / lidos	Projeção de títulos (UI/ mL)
Resposta mínima 1/4	7/8	0,07
1/4	0/8	0,12
1/8	0/8	0,25
1/16	0/8	0,5
1/32	0/8	1,0
1/64	0/8	2,0
1/128	0/8	4,0

Fonte: Do autor, 2018.

3.4.2 Determinação da potência relativa no Ensaio sorológico

As estimativas das potências relativas das vacinas foram determinadas no ES com três abordagens de cálculo. Na primeira, foi considerado o *cut-off* $\geq 0,5$ UI/ mL como título mínimo de soroconversão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005), aqui denominada como abordagem OMS (ab-OMS); na segunda, foi utilizado um modelo de linhas paralelas com o título absoluto de AN em UI/ mL de cada camundongo (ab-TAN); na terceira, o *cut-off* $\geq 0,12$ UI/ mL (MANNING et al, 2008), denominada como abordagem do *Advisory Committee on Immunization Practices - ACIP* (ab-ACIP). A potência mínima requerida foi $\geq 2,5$ UI/ dose.

Foi simulada a aplicação de um ensaio sorológico qualitativo em única diluição das vacinas, que foi denominado ensaio sorológico em diluição única (ES-

¹ O Comitê Consultivo em Práticas de Imunizações (*Advisory Committee on Immunization Practices - ACIP*) dos Estados Unidos recomenda a utilização de um nível definido como neutralização completa do vírus na diluição de 1/5 no RFFITm como um indicador de uma resposta imunológica humoral adaptativa adequada à vacinação (MANNING et al., 2008). A OMS é mais conservadora e recomenda que a resposta deve ser de pelo menos 0,5 UI/ mL (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005) o que corresponde a neutralização na diluição de 1/25. No teste de coerência desses parâmetros no CombiStats, a neutralização na diluição 1/5 equivale a neutralização completa na diluição 1/4 e título de 0,12 UI/ mL, com uma DE_{50} de 1/5,6. A neutralização completa em 1/16, com escore de oito campos positivos em oito lidos na diluição 1/32 equivale a DE_{50} 1/22,62 e título de 0,5 UI/ mL.

DU). Neste ensaio, foram avaliadas a primeira e a segunda diluição das vacinas teste contra as mesmas diluições da VacRef, verificando o desempenho do ES-DU.

3.5 Pré-validação do ensaio sorológico para potência de vacinas contra raiva

3.5.1 Demonstração da Relevância

Uma análise estatística foi realizada para examinar o desempenho do ensaio demonstrando sua Relevância (Exatidão), sua Confiabilidade (Precisão) em relação ao EPNIH e, principalmente, a capacidade para diferenciar lotes potentes de lotes subpotentes. Para demonstrar a Relevância do ES, cinco lotes foram analisados comparando os resultados com o EPNIH obtidos para as VacRef e vacinas teste. Paralelamente, amostras dessas vacinas foram submetidas a tratamento térmico. Cinco lotes subpotentes foram submetidos ao EPNIH e seis ao ES (Quadro 4).

Para o método ser considerado relevante, deve ser capaz de discriminar lotes potentes e subpotentes, ou seja, apresentar concordância com os resultados do EPNIH.

Quadro 4 - Desenho experimental para demonstrar a Relevância do ES.

	Ensaio			
	Íntegra		Tratamento térmico ¹	
	EPNIH ²	ES ³	EPNIH	ES
Vacinas	A		A	
	B		B	
	C		C	
	D		<i>nr</i>	D
	E		E	
	H	<i>nr</i>	H	
Total	6	5	5	6

¹52 ±1°C por 48h ±10 min. ²Ensaio de potência de NIH. ³Ensaio Sorológico. *nr* – não realizado.
Fonte: Do autor, 2018.

3.5.2 Avaliação da Confiabilidade do ES

A Confiabilidade foi demonstrada pela Precisão e nesta avaliação foi calculada a variabilidade interensaios por meio da variância da DE_{50} da VacRef obtida pelos soros titulados no RFFITm.

3.6 Verificação do limite inferior de imunogenicidade da glicoproteína viral

Para avaliar o limite de imunogenicidade da GLPTN, o teor deste antígeno foi determinado nas amostras de vacina pelo Laboratório de Desenvolvimento Analítico e Estabilidade do Instituto Butantan (São Paulo, SP), utilizando o *kit* D1 do Instituto Pasteur (Paris, França).

3.6.1 Determinação do teor de glicoproteína g no ensaio imunoenzimático (Elisa - do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*)

O teor de GLPTN foi determinado pelo laboratório colaborador que utilizou seu próprio protocolo interno de Elisa, aplicando o anticorpo monoclonal D1 murino (ANm-D1) (JALLET et al, 1999) tanto para o revestimento da placa como para a detecção de vírus (PERRIN et al, 1996). O isotipo ANm-D1 IgG1 reconhece o sítio antigênico III (envolvido na indução de AN do vírus) da GLPTN nativa. A GLPTN das vacinas foi quantificada contra dois padrões de referência: padrão do *kit* Instituto Pasteur D1 (GLPTN 1.000 ng/ mL) e a vacina BR013 INCQS (GLPTN 9,53 UI/ mL) (FOURNIER-CARUANA et al, 2003). As concentrações de GLPTN em cada diluição foram calculadas a partir de extrapolações obtidas do total de GLPTN determinado pelas formulações não diluídas, considerando o fator de diluição.

Para estimar a concentração mínima de antígeno capaz de induzir resposta imunológica adequada ($\geq 0,5$ UI/ mL), um estudo adicional foi conduzido com a finalidade de obter amostras de soro de camundongos imunizados com três vacinas (Vac E-G) de potência e teor de GLPTN conhecidos, objetivando atingir níveis mínimos de GLPTN e exaurir a resposta imune (Quadro 5).

Quadro 5 - Desenho experimental para avaliação do limite inferior de imunogenicidade.

Número de amostras	Ensaio	Doses	14 ^o Dia	Animais/Diluição	Total de Animais
3	ES ¹	2	S ³	10	30
	EPNIH ²		D ⁴	16	48

¹Ensaio Sorológico. ²Ensaio de potência de NIH. ³Sangria. ⁴Desafio intracerebral.
Fonte: Do autor, 2018.

Três grupos de 10 animais foram submetidos ao esquema vacinal de pré-exposição, com duas doses (dias 0 e 7), por via ip, como descrito no item 3.3.2. Três lotes de vacina foram diluídos a partir da DE₅₀, determinada no EPNIH e obtidas três diluições seriadas (fator q= 5) das vacinas teste. No Grupo 1, a vacina utilizada foi preparada na diluição da DE₅₀. No Grupo 2, foi ajustada para DE₅₀/5 por dose e no terceiro grupo, diluída DE₅₀/25 (Quadro 6).

Quadro 6 - Esquema de diluição e concentração de Glicoproteína de três lotes de vacina antirrábica.

Vacina	Teor de Glicoproteína (UI/ mL)	DE ₅₀ determinada no EPNIH*			
		Log DE ₅₀	DE ₅₀	DE ₅₀ /5	DE ₅₀ /25
E	7,4	-2,392	1/250	1/1250	1/6250
F	8,2	-3,024	1/1100	1/5500	1/27500
G	8,8	-2,298	1/200	1/1000	1/5000

*Ensaio de potência de NIH.
Fonte: Do autor, 2018.

Após as imunizações, o sangue foi coletado no dia 14 conforme descrição no item 3.4.1.4. Os soros foram titulados para determinação dos títulos de AN pelo RFFITm (item 3.4.1).

A média de AN obtidas por diluição de cada vacina em todos os ES realizados no estudo foi expressa em relação ao teor de GLPTN em ng/ mL e em UI/ mL. Os dados foram ordenados em ordem crescente pela média do título de AN e foi identificada a menor concentração capaz de induzir resposta adequada de AN ($\geq 0,5$ UI/ mL).

3.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram comparados para verificar a concordância entre os tratamentos. A Sensibilidade e a Especificidade do ES foram avaliadas para determinar o grau de similaridade entre métodos. Para a análise estatística, foram utilizados os *Softwares* Microsoft® Excel, Medicalc®, GraphPrism® e CombiStats®. Quando necessário os resultados de potência foram submetidos a uma transformação logarítmica para melhorar o ajuste à distribuição normal.

A Relevância e a Confiabilidade do ES foram analisadas em relação ao EPNIH. A Relevância foi determinada pela Sensibilidade e Especificidade (Exatidão), por meio da categorização binária dos resultados (conforme e não conforme) e construção de tabelas de contingência, possibilitando avaliar o desempenho do ES.

A distribuição normal dos resultados foi avaliada pelo teste de normalidade Omnibus D'Agostino & Pearson (MIOT, 2017). A similaridade das potências correspondentes entre os ensaios Sorológico e de NIH foram estimadas por meio dos testes *t* de Student para amostras pareadas, análise de variância (ANOVA), regressão linear simples, correlação, determinação do coeficiente de Cohen Kappa, coeficiente de concordância de correlação de Lin (ρ_c) e os intervalos de confiança (IC).

No estudo de Relevância do ES, o teste *t* de Student, ANOVA, correlação de Pearson, Sensibilidade, Especificidade, Exatidão, Valores preditivo positivo e negativo (VPP e VPN) foram aplicados para descrever o desempenho do ES. O índice de concordância de Cohen Kappa avaliou a concordância entre os testes e, principalmente, a capacidade de diferenciar lotes potentes de subpotentes. O teste C Cochran foi realizado para determinar a homogeneidade das variâncias.

Confiabilidade foi demonstrada pela Precisão (Repetibilidade) e foi determinada calculando as variâncias intra e interensaio dos títulos de AN da VacRef por diluição, após transformação logarítmica, em três corridas de RFFITm. Coeficientes geométricos de variação intra e interensaios (gCV%) foram obtidos. A Precisão do ES também foi demonstrada comparando com as potências obtidas no NIH pelo ρ_c e IC 95%.

Os resultados foram avaliados calculando-se o grau de correlação por meio de regressão linear simples e coeficiente de correlação de Pearson, a fim de determinar o grau de associação entre os dados e sua significância. A menor

concentração de GLPTN foi determinada pela inspeção visual dos resultados reordenados em ordem crescente, expressa em concentração de GLPTN em ng e UI/ mL a partir das quais foi obtido um título de AN adequado, com base no cutoff adotado. Para análise estatística, foram utilizados os softwares Microsoft® Excel, GraphPrism®, MediCalc® e CombiStats®. Quando necessário, os resultados da potência foram submetidos a uma transformação logarítmica para melhorar a distribuição normal.

Métodos estatísticos de cálculo e critérios de aceitação de ensaio foram aplicados. No EPNIH, os ensaios válidos foram aqueles em que a diluição de vírus desafio forneceu no mínimo 10 DL₅₀/ 0,03 mL via ic em camundongos; e os parâmetros estatísticos demonstraram inclinação significativa na curva dose resposta, sem desvios de linearidade e paralelismo; as DE₅₀ das VacRef e teste que estiveram situadas entre a menor e a maior dose aplicadas aos animais; a DE₅₀ da VacRef dentro dos limites de confiança de 99%; e o limite inferior de confiança da potência estimada foi maior que 0,62 UI/dose (25% de 2,5 UI/dose) (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DA QUALIDADE EM SAÚDE, 2017a).

Para o RFFITm, foi considerado válido o ensaio que a análise estatística demonstrou uma inclinação significativa na curva dose resposta e que não existiu desvios significativos de linearidade e de paralelismo. Quando houve desvios de paralelismo, foi avaliada a equivalência de inclinações, comparando-se os intervalos de confiança obtidos para a diferença e a razão entre as inclinações do padrão e das amostras. Além disso, se o intervalo de confiança obtido para a diferença compreendeu o valor 0 (zero) e o intervalo de confiança para a razão entre as inclinações o valor 1 (um), as inclinações foram então consideradas equivalentes e o paralelismo conforme. Também foram avaliados os controles não infectados (controle de células), apresentando pelo menos uma monocamada semiconfluente em cada poço; o título do vírus trabalho entre 30 e 300 DFF₅₀. As Doses inibidoras de focos fluorescentes 50% (DIFF₅₀) das imunoglobulinas de referência e teste que estavam situadas entre a menor e a maior dose utilizadas no ensaio; e a DIFF₅₀ obtida para a imunoglobulina de referência que permaneceu dentro dos limites de confiança de 99%, foram consideradas conformes (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DA QUALIDADE EM SAÚDE, 2017c).

4 RESULTADOS

4.1 Levantamento de amostras de vacinas e estimativa de animais utilizados

Na década dos anos 2000 e nos últimos oito anos, foram analisados 522 lotes de vacina contra Raiva de uso humano no INCQS, uma média de 28 lotes por ano. Ocorreu uma queda no número de lotes analisados no período observado em relação à “Era Fuenzalida”² (1974 a 1999), decorrente da mudança para um produto com número maior de ampolas envasadas por lote. O quantitativo estimado de animais utilizados nos ensaios de atividade para o controle da vacina foi bastante considerável, totalizando 26.250 camundongos. A média anual foi de 1.458 animais utilizados nos ensaios de potência. Caso esses lotes fossem testados pelo Ensaio sorológico, seria obtida uma redução aproximada de 70,20% no quantitativo de animais (Tab. 2).

² Vacina Fuenzalida & Palácios modificada – Foi utilizada nos programas de saúde pública no Brasil até o início dos anos 2000. Esta vacina foi desenvolvida no Chile, na década de 1950, por Fuenzalida e Palácios, e aperfeiçoada nos anos seguintes. Eram produzidos cerca de 100 lotes por ano da vacina em cérebro de camundongos lactentes pelo Instituto Butantan em São Paulo e Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR.

Tabela 2 - Série histórica do quantitativo de animais utilizados por lote de vacina analisado e perspectiva da diminuição no ensaio sorológico.

Ano	Lotes de vacina	Animais Utilizados	
		Estimado	Perspectiva
		NIH ¹	Ensaio Sorológico ²
"Era Fuenzalida"	>100	5700	1500
2000	87	4698	1305
2001	56	3024	840
2002	37	1998	555
2003	19	1026	285
2004	28	1344	420
2005	19	912	285
2006	25	1200	375
2007	21	1008	315
2008	12	576	180
2009	18	864	270
2010	37	1776	555
2011	30	1440	450
2012	22	1056	330
2013	35	1680	525
2014	9	432	135
2015	17	816	255
2016	22	1056	330
2017	28	1344	420
Total ³	522	26.250	7.830
Média	29 (±18)	1458 (±1002)	435 (±272)

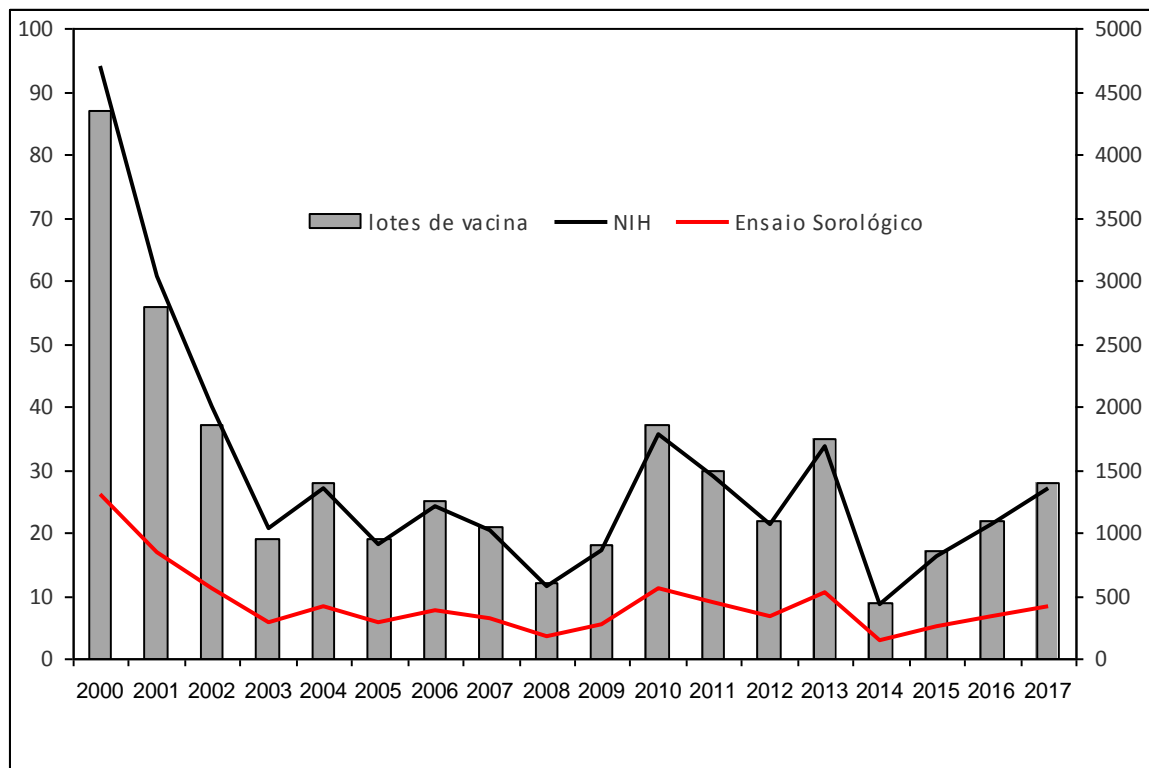
¹Até 2003 utilizavam-se 54 animais para cada lote (18/diluição), após este ano 48 animais por lote (16/diluição). ²Com o Ensaio sorológico seriam utilizados 15 animais por lote (cinco/diluição).

³Excluindo a "Era Fuenzalida".

Fonte: Do autor, 2018.

A Figura 2 demonstra a tendência do número aproximado de animais utilizados no EPNIH e a expectativa no ES para o controle dos lotes de vacina contra raiva no período de 18 anos. Ficou demonstrada a forte tendência de diminuição no quantitativo de animais no ES.

Figura 2 - Série Histórica de Lotes de Vacina Contra Raiva Humana recebidos pelo Laboratório de Vacinas Virais do INCQS – FIOCRUZ, entre 2000 e 2017 e tendência da utilização de animais nos ensaios NIH e sorológico. n= 522.



Fonte: Do autor, 2018.

4.2 Padronização do ensaio sorológico para avaliação da potência de vacinas contra raiva de uso humano e elaboração de procedimento operacional

Como parte da padronização do ES, inicialmente, foi avaliado o esquema de imunização a ser utilizado no teste e, em função dos resultados obtidos, foi elaborado o protocolo de ensaio.

4.2.1 Avaliação do esquema vacinal

Na avaliação do esquema vacinal do EPNIH, foram testados três lotes com uma e duas doses de vacina. As três vacinas testadas apresentaram melhor desempenho com esquema tradicional utilizando duas doses.

As estimativas de potências relativas e o intervalo de confiança IC das três amostras foram avaliados frente às calculadas a partir dos ensaios realizados no laboratório nacional de controle. Duas foram classificadas como conformes ($\geq 2,5$ UI/

dose) pelo requerimento mínimo de potência segundo a Farmacopeia brasileira (2010), porém apresentaram potências menores que as obtidas com o esquema vacinal tradicional, Vac A – 15,09 UI/dose (42,3 – 260,7%) contra 4,21 (24,5 – 406,2%); Vac B - 19,44 UI/dose (43,0 – 248,2%) contra 7,67 UI/dose (24,1 – 402,5%). Uma delas foi considerada não conforme (<2,5 UI/ dose) no esquema de uma dose, Vac C - 8,13 UI/dose (43,4 – 240,9%) contra 0,84 UI/dose (15,7 – 407,8%) (Tab. 3).

Tabela 3 - Avaliação do esquema vacinal do EPNIH.

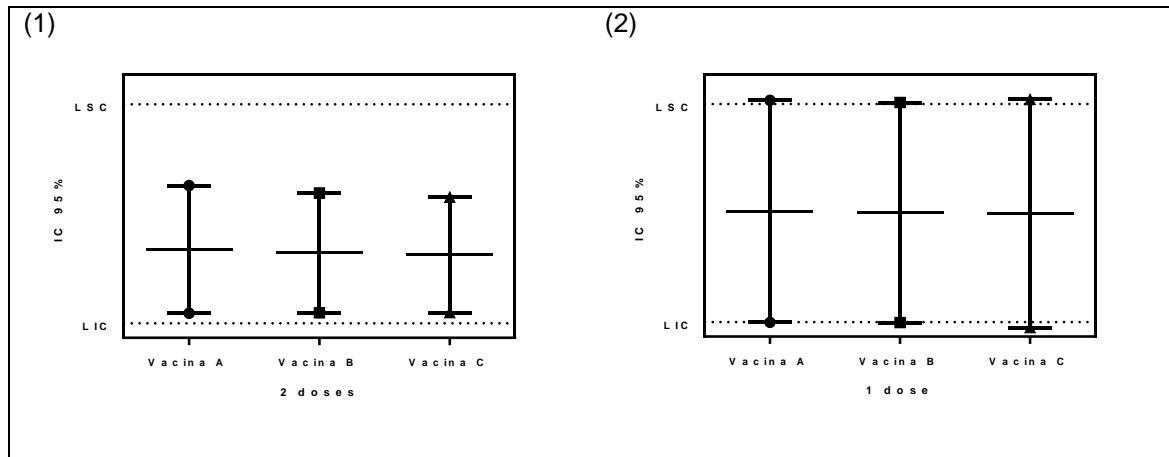
Vacinas	Potência relativa (UI/ dose) e Intervalo de Confiança (%)	
	Esquema vacinal	
	2	1
A	15,09 (42,3 – 260,7)	4,21 (24,5 – 406,2)
B	19,44 (43,0 – 248,2)	7,67 (24,1 – 402,5)
C	8,13 (43,4 – 240,9)	0,84 (15,7 – 407,8)

Intervalo de confiança 95%.

Fonte: Do autor, 2018.

Ao analisar os resultados nos dois esquemas vacinais, os IC de 95% obtidos com uma dose também estavam fora do critério de aceitação de ensaios que indica que o IC da potência estimada deve estar entre 25 e 400% (Fig. 3).

Figura 3 - (1) Intervalos de confiança (IC) e limites superior (LSC) e inferior (LIC) de 95% de confiança da potência relativa no ensaio EPNIH no esquema de duas e (2) uma dose de vacina contra raiva humana.



Fonte: Do autor, 2018.

O grau de concordância entre os EPNIH com uma e duas doses de vacina também foi calculado contra a potência declarada pelo produtor. Foi considerada a categorização “conforme” para as amostras que apresentaram potência $\geq 2,5$ UI/dose e “não conforme” para aquelas com potência $\leq 2,5$ UI/dose. No esquema de duas doses, foi observada uma concordância de 100%, enquanto que com uma dose de vacina foi de 67%, devido a uma das vacinas ter apresentado resultado discordante “não conforme” (Tab. 4).

Tabela 4 - Concordância entre as potências relativas no EPNIH entre dois esquemas vacinais contra a potência declarada pelo produtor.

Vacinas	Potência relativa ¹ (UI/ dose)	Categorização (Potência relativa - UI/ dose)	
		Esquema vacinal	
		Duas doses	Uma dose
A	4,20	CONF (15,09)	CONF (4,21)
B	14,40	CONF (19,44)	CONF (7,67)
C	4,80	CONF (8,13)	Ñ CONF (0,84)
Concordância (%)	-	100	67

¹Potência declarada pelo produtor no protocolo de produção. CONF - Conforme. Ñ CONF - Não conforme.

Fonte: Do autor, 2018.

Após esta avaliação, o esquema vacinal de duas doses foi escolhido por apresentar maior concordância com os resultados do produtor e produzir melhores IC, garantindo a consecução de ensaios válidos.

4.2.2 Elaboração do procedimento operacional padrão do ensaio sorológico

Com a adoção de duas doses para imunização dos animais, foi elaborado um protocolo de ensaio sorológico baseado, como ponto de partida, no ensaio NIH para potência de vacinas contra raiva como descrito na Farmacopeia brasileira (BRASIL, 2010a), que foi editado como POP do ES (Apêndice B). Os resultados do estudo serão utilizados na melhoria do protocolo do ensaio para uma eventual validação futura.

4.2.3 Padronização do Ensaio sorológico para potência de vacinas contra raiva de uso humano (ES)

Os soros dos camundongos imunizados obtidos com as nove vacinas (cinco potentes e quatro subpotentes) foram titulados para determinação da potência relativa, seguindo o protocolo do POP “Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas Contra Raiva”.

4.2.3.1 *Titulação de anticorpos pelo RFFITm*

A Tabela 5 apresenta os títulos de AN contra raiva *in vitro*, de 344 amostras de soros de camundongos vacinados. Os soros foram avaliados pelo RFFITm como descrito por MOURA e colaboradores (2008), em 11 corridas de ensaios, visando a pré-validação do ES.

Tabela 5 - Títulos de anticorpos neutralizantes contra raiva em UI/mL pelo RFFITm segundo Ensaio sorológico.

Ensaio	Diluição	1/25	1/125	1/625	1/25	1/125	1/625	1/50	1/250	1/1250
	Animal/Vacina	B			C			BR014		
01/17	1	2,00	0,15	0,46	1,00	0,28	0,03	1,00	3,85	0,09
	2	1,39	0,06	0,21	1,00	1,00	0,32	1,00	0,59	0,00
	3	0,13	0,00	0,25	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	0,03
	4	0,16	1,00	0,21	1,00	1,00	0,05	1,00	1,89	0,00
	5	0,32	1,00	0,25	0,43	1,00	1,00	0,37	1,00	0,25
	Diluição	1/25	1/125	1/625	1/25	1/125	1/625	1/50	1/250	1/1250
	Animal/Vacina	A			B			BR014		
02/17	1	0,47	0,21	0,00	1,00	0,03	0,25	0,93	0,88	0,31
	2	0,71	0,09	0,00	1,00	1,00	0,25	1,53	0,88	0,06
	3	1,00	0,55	0,00	1,00	0,98	0,25	0,08	0,29	0,18
	4	0,33	0,14	0,79	0,95	0,19	0,00	2,32	0,76	0,46
	5	0,71	0,32	0,00	0,08	1,00	0,25	0,28	0,03	0,25
	Diluição	1/25	1/125	1/625	1/25	1/125	1/625			
	Animal/Vacina	D			E					
01/18	1	0,00	0,36	0,00	2,32	0,46	0,25			
	2	1,10	0,03	0,08	2,00	1,18	0,40			
	3	1,96	2,04	0,00	1,52	1,00	0,17			
	4	2,00	1,00	0,19	2,00	1,00	0,25			
	5	2,00	1,92	-	2,44	0,08	0,33			
	Diluição	1/25	1/125	1/625	1/25	1/125	1/625	1/50	1/250	1/1250
	Animal/Vacina	A			BR012			BR014		
01/18	1	0,30	0,06	0,00	0,23	0,00	0,17	1,00	1,96	0,00
	2	0,36	0,00	0,00	0,07	0,24	0,52	4,24	1,00	0,03
	3	0,00	0,00	0,08	0,34	0,98	0,10	1,08	1,52	0,02
	4	0,06	0,14	0,00	0,53	0,00	0,12	1,00	1,00	0,33
	5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,03	1,00	1,00	0,09
	Diluição	1/25	1/125	1/625	1/25	1/125	1/625	1/50	1/250	1/1250
	Animal/Vacina	B			D			BR014		
02/18	1	0,35	0,05	0,00	0,96	0,00	0,00	0,25	0,45	0,88
	2	0,09	0,00	0,00	0,17	0,00	0,58	2,00	3,34	1,22
	3	0,08	0,00	0,26	0,61	0,47	0,44	2,00	0,00	0,00
	4	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,11	1,00	0,47
	5	0,26	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	1,92
	Diluição	1/25	1/125	1/625						
	Animal/Vacina	E								
02/18	1	0,00	0,00	0,56						
	2	0,28	0,67	0,24						
	3	1,55	0,00	0,14						
	4	0,52	0,06	0,13						
	5	0,10	0,07	0,00						

Cont. Tabela 5.

Ensaio	Diluição	1/25	1/125	1/625	1/25	1/125	1/625	1/50	1/250	1/1250	
	Animal/Vacina	B			C			BR014			
03/18	Diluição	1/250	1/1250	1/6250	1/250	1/1250	1/6250				
	Animal/Vacina	E			E						
	1	0,00	0,18	0,07	1,00	0,24	0,10				
	2	1,00	0,40	0,40	2,03	0,25	0,35				
	3	0,81	0,25	0,78	1,00	0,25	1,20				
	4	4,24	0,25	0,83	0,60	0,25	0,42				
	5	0,76	0,19	0,25	0,92	0,25	1,43				
04/18	Diluição	1/200	1/1000	1/5000	1/200	1/1000	1/5000				
	Animal/Vacina	G			G						
	1	2,96	0,40	0,31	1,00	0,25	0,22				
	2	1,00	0,13	0,71	5,03	0,25	0,10				
	3	1,00	0,11	0,25	0,22	0,16	0,10				
	4	0,44	0,25	0,42	0,12	0,13	0,10				
	5	0,49	0,09	0,08	1,77	0,11	0,10				
05/18	Diluição	1/25	1/125	1/625	1/50	1/250	1/1250				
	Animal/Vacina	C			BR014						
	1	0,53	0,16	0,21	2,00	1,00	0,25				
	2	0,21	0,16	0,21	2,42	1,00	0,25				
	3	0,14	0,10	0,29	2,00	1,00	0,15				
	4	0,28	0,15	0,17	0,63	2,28	0,25				
	5	0,36	0,10	0,07	3,10	1,00	0,25				
06/18	Diluição	1/50	1/250	1/1250	1/50	1/250	1/1250				
	Vacina	BR014*			BR014**						
	Pool Soro	6,22	6,70	2,45	16,16	1,23	0,61				
07/18	Diluição	1100	5500	27500	1100	5500	27500				
	Animal/Vacina	F			F						
	1	0,13	0,07	0,24	0,00	0,16	0,17				
	2	0,16	0,06	0,22	0,41	0,06	0,46				
	3	0,08	0,05	0,12	0,36	0,14	0,34				
	4	0,44	0,31	0,09	0,23	0,05	0,05				
	5	0,16	0,07	0,07	0,25	0,17	-				
08/18	Diluição	1/50	1/250	1/1250	1/50	1/250	1/1250				
	Vacina	BR014*			BR014**						
	Pools Soro	8,21	6,57	0,66	6,29	1,30	1,63				
		9,03	3,52	0,80	4,14	0,54	1,41				
09/18	Diluição	1/50	1/250	1/1250	1/50	1/250	1/1250				
	Vacina	BR014**			BR014**						
	Pool Soro	5,31	0,78	0,91	3,84	0,86	0,65				

Células hachuradas indicam soroconversão pelo *cut-off* $\geq 0,5$ UI/ mL de anticorpos neutralizantes em camundongos. Células com texto contornado indicam a soroconversão pelo *cut-off* $\geq 0,12$ UI/ mL de anticorpos neutralizantes. Vacinas de referência do *ES 01/17 e **ES 02/17. $n= 344$.

Fonte: Do autor, 2018.

Com os resultados obtidos na titulação de anticorpos contra raiva pelo RFFITm, foram determinadas as estimativas das potências relativas das amostras de vacinas para o ES. Foram utilizadas as três abordagens: (a) ab-OMS (valor de corte de soroconversão $\geq 0,5$ UI/ mL); (b) ab-TAN (ensaio quantitativo baseado no título de AN em UI/ mL individual) e (c) ab-ACIP ($\geq 0,12$ UI/ mL) (Tab. 6 e 7).

Entre as amostras subpotentes obtidas por tratamento térmico, todos os resultados foram concordantes. Não foi realizado o EPNIH com a vacina D subpotente, porém nas três abordagens de cálculo da potência relativa no ES os resultados foram idênticos (Tab. 7).

Tabela 6 - Potências relativas e intervalos de confiança de lotes de vacina obtidos pelos Ensaio sorológico e NIH contra BR014.

Vacina	Ensaio sorológico						Ensaio Potência NIH	
	ab-OMS ¹		ab-TAN ²		ab-ACIP ³		Potência (UI/ dose)	IC (%)
	Potência (UI/ dose)	IC ⁴ (%)	Potência (UI/ dose)	IC (%)	Potência (UI/ dose)	IC (%)		
A	3,61	19,2 – 500,9	1,92 a**	26,3 – 326,1	1,44**	0,00 – 4583,6	15,09	42,3 – 260,7
B	6,39*	20,6 – 515,2	3,61 a*	28,6 – 336,1	4,50	0,4 – 27436,5	19,44	43,0 – 248,2
C	6,62	13,8 – 927,2	1,69 b**	1,8 – 1062,3	6,88a	13,0 – 1186,5	8,13	43,4 – 240,9
D	6,39	20,6 – 515,2	10,34a	30,1 – 393,9	0,95**	0,0 – 3819,8	8,70 [†]	46,0 – 229,7
E	9,46	21,2 – 535,1	17,21c	30,7 – 413,5	8,18	0,9 – 1,4 ⁷	6,80 [†]	50,0 – 198,5

Abordagens de determinação da potência: ¹cut-off $\geq 0,5$ UI/ mL como título mínimo de soroconversão; ²título de AN em UI/ mL e ³cut-off $\geq 0,12$ UI/ mL. ⁴Intervalo de confiança. Critérios de validade: inclinação significativa na curva dose resposta; não existir desvios significativos da linearidade e paralelismo; as DE₅₀ das vacinas de referência e teste estarem situadas entre a menor e a maior dose aplicadas aos animais; a DE₅₀ obtida para a vacina de referência permaneça dentro dos limites de confiança de 99%, a potência $\geq 2,5$ UI/dose e o limite inferior de confiança da potência estimada seja maior que 0,62 UI/dose (25% de 2,5 UI/dose). Amostras de ensaio inválido estão marcadas com: “a”, representando não-paralelismo (nível de significância $p > 0,05$), foi utilizado o teste estatístico de equivalência no CombiStats® e as inclinações foram consideradas equivalentes e por consequência o não-paralelismo satisfatório; “b”, não-linearidade. “c”, indicando não-paralelismo mesmo após o teste de equivalência. *Amostra com potência não conforme foi repetida. **Potência não conforme. [†]Potência calculada pelo produtor.

Fonte: Do autor, 2018.

Tabela 7 - Potência relativa e intervalo de confiança obtidos pelos ensaios de potência sorológico e NIH após tratamento térmico.

Vacinas	Ensaio sorológico						Ensaio Potência NIH	
	ab-OMS ¹		ab-TAN ²		ab-ACIP ³		Potência (UI/ dose)	IC (%)
	Potência (UI/ dose)	IC ⁴ (%)	Potência (UI/ dose)	IC (%)	Potência (UI/ dose)	IC (%)		
A	0,00 [†]	-	0,02	0,0 – 1601,8	0,07 [†]	-	0,00 [†]	-
B	0,00 [†]	-	0,00 [†]	-	0,00 [†]	-	0,00 [†]	-
C	0,25	56,9 – 175,8	0,18	6,0 – 395,4	0,00 [†]	-	0,02	0,8 – 618,3
D	0,00 [†]	-	0,00 [†]	-	0,00 [†]	-	<i>nr</i>	-
E	0,00 [†]	-	0,00 [†]	-	0,03 [†]	-	0,05	2,2 – 427,5

Abordagens de cálculo da potência: ¹*cut-off* ≥0,5 UI/ mL; ²título de AN em UI/ mL e ³*cut-off* ≥0,12 UI/ mL. ⁴Intervalo de confiança. Tratamento térmico 52^o ±1°C por 48h ±10 min. [†]Não foi possível determinar o intervalo de confiança. *nr* – não realizado.

Fonte: Do autor, 2018.

4.2.3.2 Definição do modelo estatístico para cálculo de resultados

As três abordagens de cálculo da potência foram testadas, obtendo-se três conjuntos de dados em um total de 30 resultados de potência. Somando-se a estes os resultados obtidos no EPNIH, no total, 39 resultados de potências relativas foram comparados. Os resultados foram examinados para o ajuste à distribuição Normal pelo teste de normalidade Omnibus D'Agostino & Pearson (MIOT, 2017). A Tabela 8 apresenta uma análise de dados exploratória.

Tabela 8 - Teste de normalidade Omnibus D'Agostino & Pearson das potências obtidas nas três abordagens do ES e no EPNIH.

Descritores estatísticos	Ensaio			EPNIH
	Sorológico			
	ab-OMS ¹	ab-TAN ²	ab-ACIP ³	
<i>N</i>	9	9	9	9
Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00
Mediana	3,61	1,69	0,95	6,80
Máximo	9,46	17,21	8,18	19,44
Média	3,64	3,89	2,46	6,47
Desvio Padrão (DP)	3,69	5,99	3,23	7,22
DP da Média	1,23	2,00	1,08	2,41
LIC ⁴ 95% da Média	0,80	-0,71	-0,02	0,92
LSC ⁵ 95% da Média	6,47	8,49	4,94	12,02
D'Agostino & Pearson				
<i>K</i> ²	2,426	8,542	2,303	1,210
<i>p</i> valor	0,2973	0,0140	0,3161	0,5460
Passa no teste normalidade ($\alpha=0,05$)?	Sim	Não	Sim	Sim

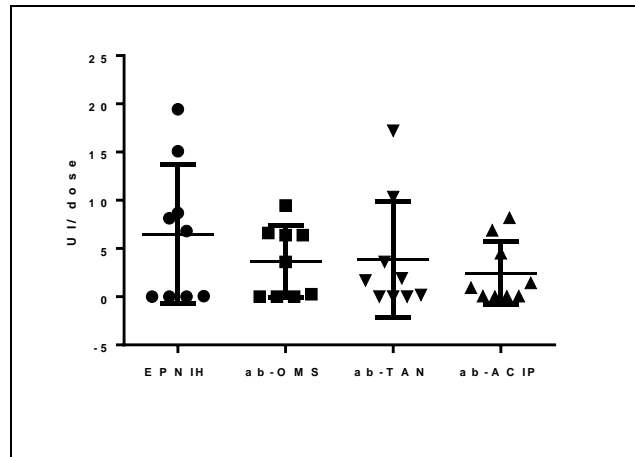
Abordagens de cálculo da potência: ¹cut-off $\geq 0,5$ UI/ mL; ²título de AN em UI/ mL e ³cut-off $\geq 0,12$ UI/ mL. ⁴Limite inferior e ⁵superior de confiança.

Fonte: Do autor, 2018.

Os resultados de potência relativa obtidos no ES também foram comparados pela ANOVA. O teste foi aplicado para verificar se os soros possuíam a mesma média, determinando se existia diferença significativa nos resultados. Embora existisse heterogeneidade entre os valores absolutos das potências relativas das vacinas (F 4,51; p 0,0016), esta avaliação demonstrou não haver diferenças significativas entre o EPNIH e as três abordagens do ES (F 1,759; p 0,2134). O

gráfico ANOVA apresenta a comparação dos resultados do ES nas três diferentes abordagens de cálculo com os obtidos no EPNIH (Fig. 4).

Figura 4 - Análise da variância das potências obtidas no EPNIH e em três abordagens do ES cut-off $\geq 0,5$ UI/ mL (ab-OMS); título de AN em UI/ mL (ab-TAN) e cut-off $\geq 0,12$ UI/ mL (ab-ACIP).



Fonte: Do autor, 2018.

A partir desses achados, os três modelos de determinação da potência no ES tiveram a Relevância e a Confiabilidade avaliados.

4.3 Pré-validação do ensaio sorológico para a determinação da potência de vacinas contra raiva de uso humano

Os resultados do ES nas três abordagens propostas foram comparados com a potência determinada no EPNIH pelo teste t , correlação de Pearson, concordância de Cohen Kappa, coeficiente de concordância de correlação de Lin (ρ_c) e pelos intervalos de confiança de 95% IC.

4.3.1 Relevância

O teste t pareado foi aplicado para verificar a concordância entre os resultados, incluindo as vacinas subpotentes, do ES com as potências calculadas pelas ab-OMS, ab-TAN e ab-ACIP com o EPNIH. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as potências relativas obtidas para as amostras, com nível de significância de 5% para um n de nove pares de amostras (Tab. 9).

Tabela 9 - Teste *t* pareado das potências relativas obtidas nos ensaios sorológico e NIH de cinco lotes de vacinas.

Teste <i>t</i> *	Descritores estatísticos						
	Média das diferenças	Desvio padrão	IC ¹ (%)	Grau de liberdade	<i>t</i>	<i>p</i> valor	<i>r</i>
ab-OMS ²	-0,1094	0,2308	-0,2868 - 0,06795		1,423	0,2019	0,9267
ab-TAN ³	-0,1590	0,3817	-0,4524 to 0,1344	8	1,250	0,2468	0,7514
ab-ACIP ⁴	-0,2273	0,3585	-0,5029 to 0,04822		1,902	0,0936	0,7870

*Teste *t* incluindo vacinas subpotentes. ¹Intervalo de confiança. Abordagens de cálculo da potência: ²cut-off $\geq 0,5$ UI/ mL; ³título de AN em UI/ mL e ⁴cut-off $\geq 0,12$ UI/ mL. $\alpha = 0,05$.

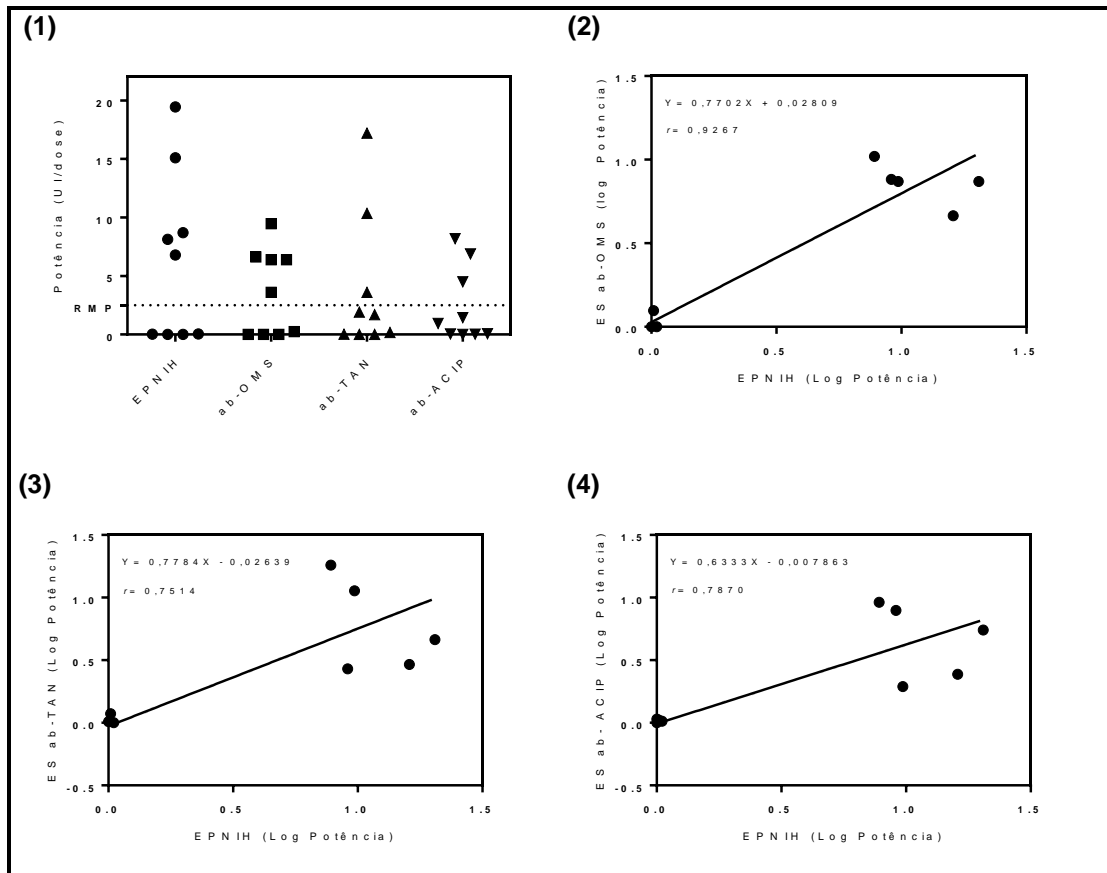
Fonte: Do autor, 2018.

As evidências estatísticas demonstraram que a ab-OMS apresentou o melhor desempenho. A diferença entre as médias foi -0,1094, com um desvio padrão de 0,2308 (*t* 1,423; *p* 0,2019; *r* 0,9267). Ao comparar o ES pela ab-TAN com o EPNIH, o teste *t* pareado demonstrou que os resultados também foram concordantes, apesar de duas amostras serem não conformes no ES (Vacinas A e C, potência <2,5 UI/ dose). As amostras também foram consideradas estatisticamente semelhantes com o ES na ab-ACIP, não obstante, duas amostras (A e D) apresentarem potências não conformes.

A Figura 5 apresenta a potência relativa (UI/ mL) no EPNIH e no ES das três abordagens diferentes de cálculo de nove lotes de vacina contra raiva de uso humano (Fig. 5.1). Na determinação da potência pela ab-OMS, cinco lotes foram considerados conforme ($\geq 2,5$ UI/ dose) e nas outras duas abordagens três lotes.

No estudo de correlação das três abordagens de determinação da potência relativa no ES, comparado com o EPNIH, todos os coeficientes de Pearson foram significativos (*p* <0,05). A correlação utilizando a ab-OMS apresentou a maior concordância com o EPNIH, com *r* 0,9267 (*r*² 0,8589) e equação da regressão linear $Y = 0,7702X + 0,02809$ (Fig. 5.2). Na ab-TAN houve uma forte semelhança e obteve-se um coeficiente de correlação *r* 0,7514 (*r*² 0,5645) para $Y = 0,7784X - 0,02639$ (Fig. 5.3). Os resultados também apresentaram uma forte correlação quando foi utilizada a ab-ACIP, *r* 0,7870 (*r*² 0,6193) e com equação da reta $Y = 0,6333X - 0,007863$ (Fig. 5.4).

Figura 5 - (1) Abordagens de cálculo da potência relativa; RMP- requerimento mínimo de potência ($\geq 2,5$ UI /dose). Correlação de Pearson do logaritmo das potências (2) pela ab-OMS; (3) ab-TAN; e (4) ab-ACIP. n= 9.



Fonte: Do autor, 2018.

Na análise da Relevância, todos os resultados foram concordantes entre o ES e EPNIH quando a potência relativa foi calculada pela ab-OMS. Duas amostras foram reprovadas na abordagem de cálculo da potência no ES utilizando a ab-TAN (Vacina A - 1,92 UI/dose, IC 26,3 – 326,1%; Vacina C – 1,69 UI/dose, IC 1,8 – 1062,3%). Ao determinar a potência pela ab-ACIP, duas amostras também foram reprovadas (Vacina A – 1,44 UI/dose, IC 0,00 – 4583,6%; Vacina D – 0,95 UI/dose, IC 0,00 – 3819,8) (Tab. 6 e 7).

Na Relevância do ES, foram determinados também: a Sensibilidade, a Especificidade, a Exatidão, o VPP e VPN, descrevendo o desempenho do ES. Na comparação pela ab-OMS, todos os índices encontrados foram de 100%, demonstrando um desempenho perfeito. Ao examinar ES pelas ab-TAN e ab-ACIP, ambas apresentaram Sensibilidade de 60,00%, Especificidade 100,00%, Exatidão de 77,78% e VPP de 100,00% e VPN de 66,67% (Tab. 10).

Tabela 10 - Sensibilidade, Especificidade, Valores preditivo positivo e negativo e Exatidão do Ensaio sorológico contra o Ensaio NIH.

Descritores	Ensaio sorológico					
	ab-OMS ¹		ab-TAN ²		ab-ACIP ³	
	%	IC ⁴ 95%	%	IC 95%	%	IC 95%
Sensibilidade	100,00	47,82 – 100,00	60,00	14,66 – 94,73	60,00	14,66 – 94,73
Especificidade	100,00	39,76 – 100,00	100,00	39,76 – 100,00	100,00	39,76 – 100,00
Valor preditivo positivo	100,00	-	100,00	-	100,00	-
Valor preditivo negativo	100,00	-	66,67	40,60 – 85,40	66,67	40,60 – 85,40
Exatidão	100,00	66,37 – 100,00	77,78	39,99 – 97,19	77,78	39,99 – 97,19

Abordagens de cálculo da potência: ¹cut-off $\geq 0,5$ UI/ mL; ²título de AN em UI/ mL e ³cut-off $\geq 0,12$ UI/ mL. ⁴Intervalo de confiança. Fonte: Medicalc® *on line*, endereço: https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php. $n= 10$.

Fonte: Do autor, 2018.

O mesmo teste para descrever o desempenho do ES foi utilizado para avaliar as diferenças dos resultados das potências de vacinas contra raiva obtidas entre o EPNIH e o ES-DU (ensaio sorológico em diluição única da vacina). Esta emulação foi aplicada às potências relativas determinadas pelas ab-OMS e ab-TAN onde se obteve melhores resultados nas avaliações anteriores, sendo consideradas aprovadas quando não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$). Amostras de ensaios inválidos também foram incluídas, uma vez que a linearidade e o paralelismo não são avaliados em ensaios de diluição única das vacinas.

Nas duas abordagens de avaliação da potência, foram encontradas Sensibilidade de 100,00%, Especificidade 60,00%, Exatidão de 83,33% e VPP de 77,78% e VPN de 100,00%. Essas determinações foram repetidas após a exclusão arbitrária de duas amostras que apresentaram comportamento anômalo no cálculo pelo programa computacional e todos os índices passaram a 100%, melhorando o desempenho do ES-DU (Tab. 11).

Tabela 11 - Sensibilidade, Especificidade, Valores preditivo positivo e negativo e Exatidão do ensaio sorológico em diluição única da vacina contra o ensaio NIH.

Descritores	ES ¹ diluição única			
	%	IC ² 95%	% [†]	IC 95%
Sensibilidade	100,00	59,04 – 100,00	100,00	59,04 – 100,00
Especificidade	60,00	14,66 – 94,73	100,00	29,24 – 100,00
Valor preditivo positivo	77,78	54,47 – 91,10	100,00	-
Valor preditivo negativo	100,00	-	100,00	-
Exatidão	83,33	51,59 – 97,91	100,00	69,15 – 100,00

¹Ensaio sorológico nas abordagens de cálculo da potência *cut-off* $\geq 0,5$ UI/ mL e título de AN em UI/ mL. ²Intervalo de confiança. [†]Cálculo excluindo as vacinas B e E. Fonte: Medicalc® *on line*, endereço: https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php. *n*= 12.

Fonte: Do autor, 2018.

Os coeficientes de Cohen Kappa para os resultados do ES estão representados na Tabela 12. Após a categorização em “conforme” e “não conforme”, para as amostras concordantes e discordantes com o EPNIH, respectivamente. A relação entre o ES pela ab-OMS apresentou força de concordância perfeita (Kappa 1,0). Na avaliação do ES pela ab-TAN e ab-ACIP, os resultados foram iguais com força de concordância considerada moderada (Kappa 0,571).

Tabela 12 - Coeficientes Cohen Kappa do ensaio sorológico contra o ensaio NIH.

Ensaio sorológico	Concordância (%)	Kappa ¹
ab-OMS ²	100,00	1,000
ab-TAN ³	77,78	0,571
ab-ACIP ⁴	77,78	0,571

¹coeficiente de Cohen Kappa para intervalo de confiança 95%. Abordagens de cálculo da potência: ²*cut-off* $\geq 0,5$ UI/ mL; ³título de AN em UI/ mL e ⁴*cut-off* $\geq 0,12$ UI/ mL. Fonte de cálculo *on line*: <https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa2/>. *n*= 9.

Fonte: Do autor, 2018.

Uma avaliação semelhante com o coeficiente de Cohen Kappa foi realizada para os resultados do ES-DU. As amostras foram categorizadas em “conforme”, para aquelas que apresentaram potência maior ou igual a da VacRef, e “não conforme” para as que foram menores. Ao utilizar a primeira diluição das vacinas na avaliação das potências, os resultados entre ES pela ab-OMS e ab-TAN foram os mesmos, com uma boa concordância com EPNIH (Kappa 0,636; $n= 12$). Após excluir duas amostras que apresentaram comportamento discrepante no cálculo da potência pelo programa computacional, a correlação melhorou e apresentou força de concordância perfeita (Kappa 1,0; $n= 10$,). Avaliando pela segunda diluição das vacinas, o ES-DU pela ab-OMS apresentou concordância muito boa com o EPNIH (Kappa 0,824), enquanto que pela ab-TAN foi considerada boa (Kappa 0,657) (Tab. 13).

Tabela 13 - Coeficientes Cohen Kappa do ensaio sorológico em diluição única contra o ensaio NIH.

Diluição da vacina	ES ¹	<i>n</i>	Concordância (%)	Kappa
Primeira	ab-OMS ²	12	83,33	0,636
	ab-TAN ³			
	ab-OMS	10*	100,00	1,000
	ab-TAN			
Segunda	ab-OMS	12	91,67	0,824
	ab-TAN	12	83,33	0,657

¹Ensaio sorológico. ²*cut-off* $\geq 0,5$ UI/ mL e ³título de AN em UI/ mL. *Vacinas B e E excluídas. Intervalo de confiança do coeficiente Kappa Cohen 95%. Fonte: <https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa2/>.

Fonte: Do autor, 2018.

A Precisão do ES foi demonstrada comparando este com as potências obtidas no EPNIH. Foram analisados os pc e os IC do ES ao determinar as potências relativas das vacinas pela ab-OMS e ab-TAN.

Os pc para o ES pelas duas abordagens de determinação da potência foram considerados satisfatórios (0,88 e 0,70). O coeficiente de Pearson obtido para o ES pela ab-OMS foi excelente (0,93), demonstrando maior Precisão que o ES pela ab-TAN, onde se obteve p satisfatório (0,75). O ES pela ab-OMS demonstrou melhor

desempenho e, em condições ideais, pode apresentar 93% de Precisão, ou seja, de concordância com o EPNIH. Também foi determinado que as Veracidades (tendência de desvio do valor verdadeiro) foram excelentes (0,95 e 0,93) (Tab. 14).

Tabela 14 - Coeficientes de concordância de Lin do ensaio sorológico contra o EPNIH.

Descritores estatísticos	Ensaio Sorológico	
	ab-OMS ¹	ab-TAN ²
ρ^3	0,88	0,70
Intervalo confiança 95%	0,63 - 0,96	0,18 - 0,91
Precisão (Pearson ρ)	0,93	0,75
Veracidade	0,95	0,93

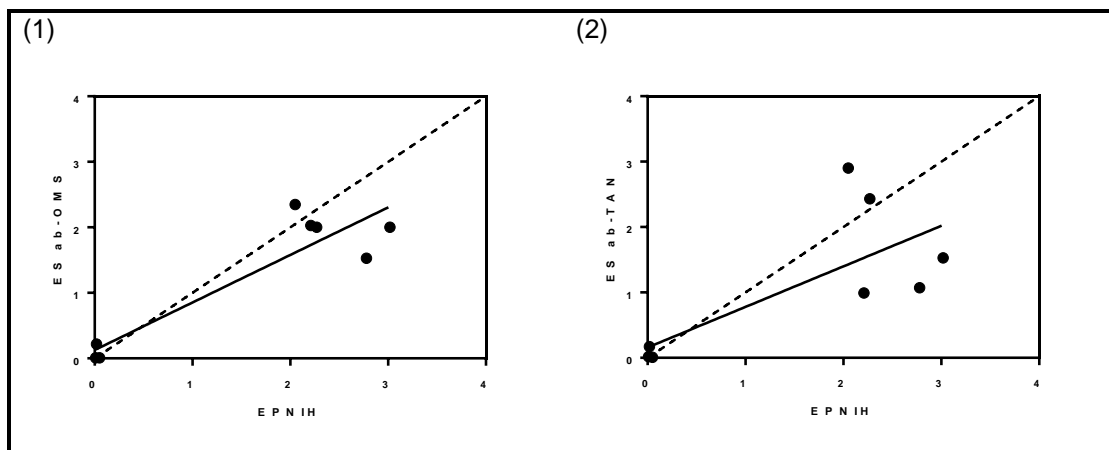
Abordagens de determinação da potência: ¹cut-off $\geq 0,5$ UI/ mL e ²título de AN em UI/ mL.

³Coeficientes de correlação de concordância de Lin. $n= 9$.

Fonte: Do autor, 2018.

Os gráficos correspondentes aos ρ^3 do ES e EPNIH estão apresentados na Figura 6. Foi observada uma concordância satisfatória e ficaram comprovadas melhores concordância e correlação do ES pela ab-OMS com o EPNIH em comparação com a ab-TAN (Fig. 6.1).

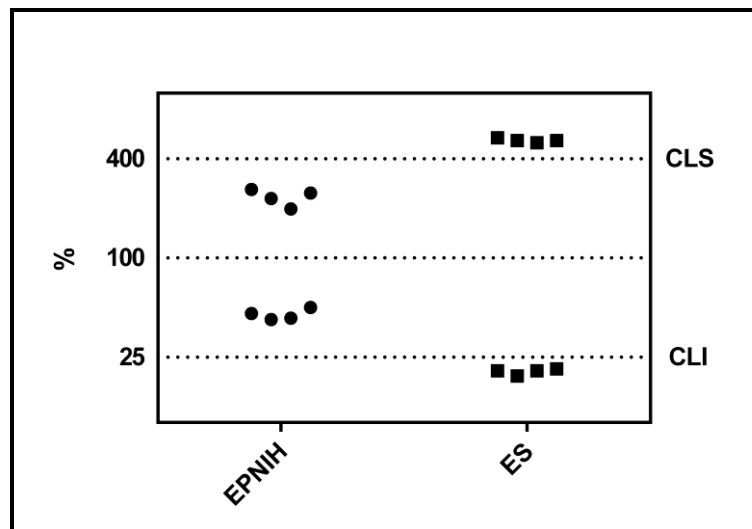
Figura 6 - (1) Coeficiente de concordância de correlação de Lin (ρ^3) do ES pela abordagem de determinação da potência cut-off $\geq 0,5$ UI/ mL (ab-OMS) e (2) título de AN em UI/ mL (ab-TAN). Intervalos de confiança 95%. $n= 9$.



Fonte: Do autor, 2018.

Os IC das potências relativas das vacinas nos ensaios NIH e sorológico pela ab-OMS foram plotados na Figura 7. Para demonstrar a Precisão do ES, os gráficos foram construídos com o limite de confiança inferior equivalente a 25% do requerimento mínimo de potência de 2,5 UI/ dose ($\geq 0,62$ UI/ dose) e o superior de 400% (10,00 UI/ dose) como preconizado para o EPNIH. Os limites da vacina C eram muito amplos, portanto, esta amostra discrepante foi excluída devido à sua alta variabilidade, permitindo elaborar um gráfico mais didático. Observou-se que os valores de potência calculados no ES pela ab-OMS ficaram fora do IC (Fig. 7).

Figura 7 - Intervalos de confiança superior (CLS) e inferior (CLI) das potências relativas determinadas nos ensaios NIH e sorológico pelo cut-off $\geq 0,5$ UI/ mL (ab-OMS). A vacina C foi excluída devido à alta variabilidade. n = 4



Fonte: Do autor, 2018.

4.3.2 Confiabilidade

Os *pools* de soros de animais imunizados com três diferentes diluições (1/50; 1/250 e 1/1250) da VacRef (BR014) de dois ES independentes (ES 01 e 02/17) foram utilizados para determinar a Confiabilidade. Foram calculadas as variâncias intra e interensaios dos logaritmos dos títulos AN (UI/ mL) por diluição no RFFITm, testados em três corridas. Foram obtidos os gCV% intraensaios de 31,99 (ES 01/17) e 31,65 (ES 02/17) e o gCV% interensaios de 31,82% (Tab. 15).

Tabela 15 - Coeficientes de variação intraensaio e interensaio do ensaio sorológico.

Ensaio sorológico	01/17			02/17		
	Diluições BR014	1/50	1/250	1/1250	1/50	1/250
R1*	0,79	0,83	0,39	1,21	0,09	-0,21
R2	0,91	0,82	-0,18	0,80	0,11	0,21
R3	0,96	0,55	-0,10	0,62	-0,27	0,15
R4	-	-	-	0,73	-0,11	-0,04
R5	-	-	-	0,58	-0,07	-0,19
VAR	0,007	0,025	0,095	0,063	0,024	0,037
VAR intra	-	0,0423	-	-	0,0415	-
gCV% intra	-	31,99	-	-	31,65	-
VAR inter			0,0419			
gCV% inter			31,82			

*Replicatas dos logaritmos dos títulos AN (UI/ mL) por diluição no RFFITm. VAR – variância; VAR intra – variância intraensaio; gCV% intra – coeficiente de variação intraensaio; VAR Inter – variância interensaio; gCV% inter - coeficiente de variação inter-ensaio.

Fonte: Do autor, 2018.

A homogeneidade das variâncias foi demonstrada pelo teste de Cochran.

4.4 Verificação do limite inferior de imunogenicidade da glicoproteína

Na Tabela 16, estão apresentados os teores de GLPTN obtidos pelo Elisa de sete lotes de vacina contra raiva. Inclui ainda a concentração de GLPTN declarada pelo produtor no protocolo de produção e as potências das vacinas no EPNIH e ES pela ab-OMS.

Tabela 16 - Teor de Glicoproteína de vacinas contra raiva frente a duas vacinas de referência e potência nos ensaios NIH e sorológico.

Vacinas	GLPTN ¹		GLPTN declarada produtor (UI/ mL)	Potência (UI/ dose)	
	(ng/ mL) ²	(UI/ mL) ³		EPNIH	ES ab-OMS ⁴
B	101,50	4,56	6,60	19,44	6,39
C	106,43	5,08	6,60	8,13	6,62
E	96,99	6,62	7,40	6,80	9,46
F	88,07	3,30	8,20	17,60	<i>nr</i>
G	132,38	6,75	8,80	4,40	<i>nr</i>
H	107,08	4,45	<i>na</i>	12,30	<i>nr</i>
BR014	97,91	3,46	4,00	9,00	<i>nr</i>

¹Teor de Glicoproteína no Elisa utilizando anticorpo de cobertura e detecção D1 murino.

²Contra vacina de referência Pasteur (1.000 ng/ mL) e ³vacina BR013 (6,75 UI/ mL).

⁴Determinação da potência relativa pelo *cut-off* $\geq 0,5$ UI/ mL. *nr* – não realizado. *na* – não aplicável.

Fonte: Do autor, 2018.

Na estimativa do limite de imunogenicidade, os títulos foram expressos em ng/ mL e UI/ mL de GLPTN para cada diluição das vacinas no ES pela ab-OMS. O logaritmo do teor de GLPTN foi pareado com o logaritmo das médias dos títulos de AN dos camundongos obtidos pelo RFFITm. Após este procedimento, as concentrações foram ordenadas em valor crescente para verificar a partir de qual concentração houve soroconversão eficaz ($\geq 0,5$ UI/ mL). Na avaliação do teor de GLPTN contra a vacina de referência BR013, comparada às médias dos títulos de AN, houve soroconversão a partir da concentração de 0,0138 UI/ mL de GLPTN. Após a revisão dos resultados individuais de AN dos camundongos, foram identificados respondedores anormais³ e procedeu-se a retirada desses resultados dos cálculos das médias (vacina B - um camundongo na diluição 1/125; vacina E - dois camundongos nas diluições 1/1250 e 1/6250). Uma exceção (BR014, 1/1250) foi detectada, onde ocorreu soroconverção (0,90 UI/ mL) com uma concentração de 0,00277 UI/ mL de GLPTN (Tab. 17).

³ Animais não respondedores.

Tabela 17 - Teor de Glicoproteína de vacina contra raiva frente ao padrão vacina BR013 e médias dos títulos de anticorpos neutralizantes de camundongos.

GLPTN ¹	Título AN ²	GLPTN	Título AN	GLPTN	Título AN
0,00012	0,15	0,00530	0,25	0,03377	1,18
0,00012	0,26	0,00530	0,25	0,03377	1,63
0,00060	0,11	0,00675	0,20	0,03649	0,55**
0,00060	0,12	0,00675	0,18	0,03649	0,64
0,00106	0,24*	0,00730	0,28	0,04064	0,86
0,00106	0,29*	0,00730	0,20	0,05300	0,74
0,00135	0,35	0,00813	0,28	0,06920	2,03
0,00135	0,12	0,01060	0,28	0,06929	0,87
0,00277	0,23	0,01384	1,26	0,06929	1,03
0,00277	0,07	0,01386	1,67	0,06929	1,00
0,00277	0,25	0,01386	0,57	0,06929	1,47
0,00277	0,09	0,01386	1,00	0,18246	0,80
0,00277	0,90	0,01386	1,03	0,18246	0,81
0,00300	0,19	0,02650	1,36	0,20318	0,89
0,00300	0,25	0,02650	1,11	0,26499	2,06

¹Logaritmo do teor de Glicoproteína (UI/ mL) no Elisa contra o padrão vacina de referência BR013. ²Logaritmo da média dos títulos de anticorpos neutralizantes (UI/ mL) pelo RFFITm por diluição de vacina. Células rachuradas indicam soroconversão $\geq 0,5$ UI/mL. *Média de AN após remoção de dois animais. **Média após remoção de um animal. $n= 45$.

Fonte: Do autor, 2018.

Ao determinar o teor de GLPTN contra o padrão vacina Pasteur a soroconversão ocorreu a partir da concentração de 0,388 ng/ mL de GLPTN. A vacina BR014 (1/1250) também apresentou soroconverção com teor menor de GLPTN (0,078 ng/ mL). O mesmo procedimento de retirada de respondedores anormais foi adotado no cálculo das médias dos títulos de AN (Tab. 18).

Tabela 18 - Teor de Glicoproteína de lotes de vacina contra raiva frente a referência Pasteur e médias dos títulos de anticorpos neutralizantes de camundongos.

GLPTN ¹	Título AN ²	GLPTN	Título AN	GLPTN	Título AN
0,003	0,15	0,080	0,19	0,662	1,18
0,003	0,26	0,080	0,25	0,662	1,63
0,016	0,24*	0,016	0,20	0,776	0,74
0,016	0,29*	0,003	0,18	0,812	0,55**
0,016	0,11	0,155	0,28	0,812	0,64
0,016	0,12	0,162	0,28	0,851	0,86
0,003	0,35	0,162	0,20	1,958	0,87
0,001	0,12	0,170	0,28	1,958	1,03
0,078	0,25	0,388	1,36	1,958	1,00
0,078	0,25	0,388	1,11	1,958	1,47
0,078	0,07	0,392	1,67	1,958	2,03
0,078	0,25	0,392	0,57	3,880	2,06
0,078	0,09	0,392	1,00	4,060	0,80
0,078	0,90	0,392	1,03	4,060	0,81
0,078	0,23	0,392	1,26	4,257	0,89

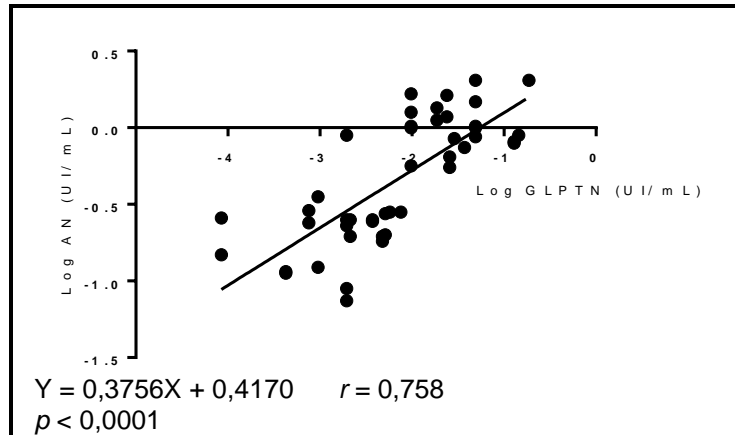
¹Logaritmo do teor de Glicoproteína (ng/ mL) no Elisa contra o padrão de referência Pasteur.

²Logaritmo da média dos títulos de anticorpos neutralizantes (UI/ mL) pelo RFFITm por diluição de vacina. Células rachuradas indicam soroconversão $\geq 0,5$ UI/ mL. *Média de AN após remoção de dois animais. **Média após remoção de um animal. $n= 45$.

Fonte: Do autor, 2018.

Uma regressão linear foi realizada a fim de verificar se houve associação entre os logaritmos das médias dos títulos de AN dos camundongos obtidos pelo RFFITm e os resultados do teor de GLPTN (UI/ mL) contra BR013. Foi observado que a relação entre estes dois resultados apresentou uma correlação significativa ($r = 0,7580$; $p < 0,0001$) (Fig. 8).

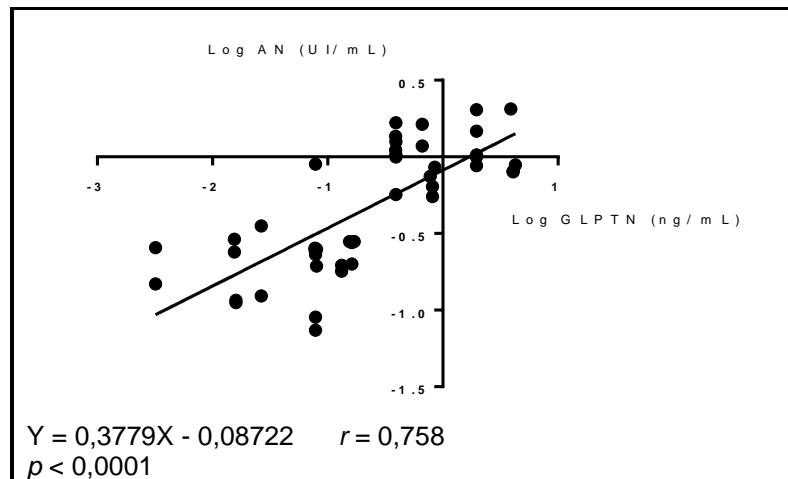
Figura 8 - Regressão linear dos logaritmos das médias dos títulos de anticorpos neutralizantes de camundongos (Log AN) contra o do teor de Glicoproteína (Log GLPTN) de lotes de vacina contra raiva frente a referência BR013.



Fonte: Do autor, 2018.

Os logaritmos das médias dos títulos de AN também foram comparados pela regressão linear com o teor de GLPTN (ng/ mL) contra referência Pasteur. Uma vez mais, os resultados apresentaram correlação significativa ($r = 0,758$; $p < 0,0001$) (Fig. 9).

Figura 9 - Regressão linear dos logaritmos das médias dos títulos de anticorpos neutralizantes de camundongos (Log AN) contra o do teor de Glicoproteína (Log GLPTN) de lotes de vacina contra raiva frente a referência Pasteur.

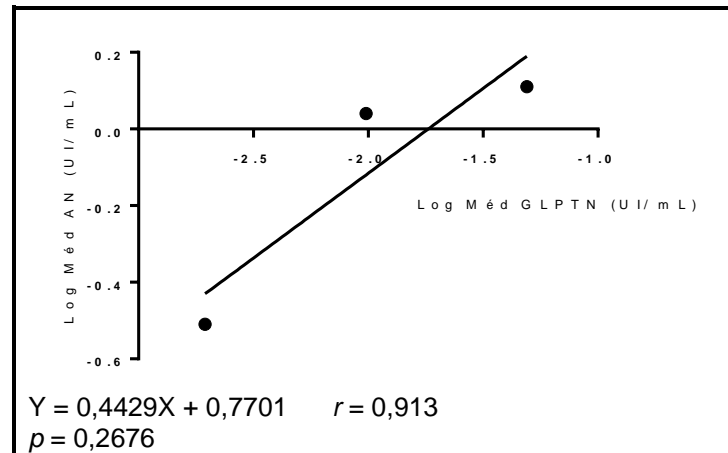


Fonte: Do autor, 2018.

O mesmo procedimento foi aplicado aos logaritmos das médias dos títulos de AN da vacina BR014. A regressão linear demonstrou que os resultados foram correlacionados com o teor de GLPTN (UI/ mL) com a vacina BR013 como padrão. A equação da reta foi $Y = 0,4429X + 0,7701$ ($r = 0,913$; $p = 0,2676$) (Fig. 10). Apesar do valor de r ser alto, indicando forte correlação linear dos dados, o valor de p ($>0,05$)

demonstrou não haver significância estatística na correlação devido ao pequeno número de valores.

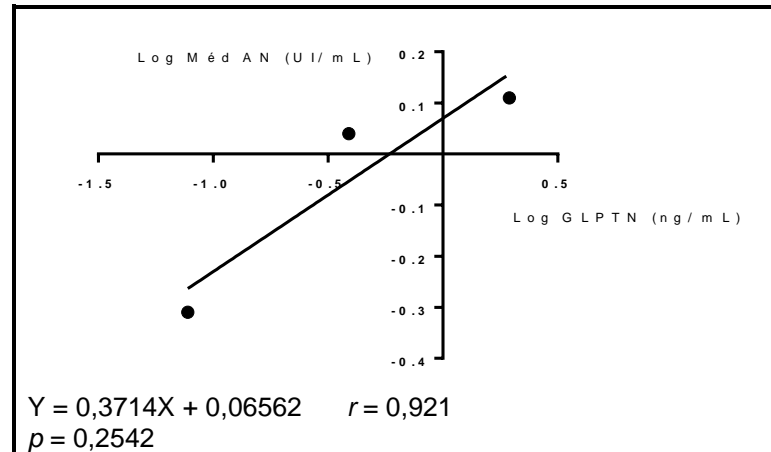
Figura 10 - Regressão linear dos logaritmos das médias dos títulos de anticorpos neutralizantes (Log Méd AN) de camundongos da vacina BR014 e do teor de Glicoproteína (Log GLPTN) de lotes de vacina contra raiva frente a referência BR013.



Fonte: Do autor, 2018.

A regressão linear dos logaritmos das médias dos títulos de AN da vacina BR014 contra o teor de GLPTN (ng/ mL) frente a referência Pasteur também apresentou os resultados correlacionados. A equação da reta foi $Y = 0,3714X + 0,06562$ ($r = 0,921$; $p = 0,2542$) (Fig. 11). Apesar do valor de r ser alto, mostrando forte correlação linear dos dados, o valor de p ($>0,05$) indicou não haver significância estatística na correlação devido ao pequeno número de valores.

Figura 11 - Regressão linear dos logaritmos das médias dos títulos de anticorpos neutralizantes (Log Méd AN) de camundongos da vacina BR014 e do teor de Glicoproteína (Log GLPTN) de lotes de vacina contra raiva frente a referência Pasteur.



Fonte: Do autor, 2018.

Após esta verificação, foi estabelecido que a concentração mínima de GLPTN capaz de induzir resposta imunológica satisfatória ($\geq 0,5$ UI/mL) para as vacinas deste estudo, e garantir a eficácia, foi de 0,0138 UI/ mL ou 0,388 ng/ mL.

Com os resultados do estudo foram publicados dois artigos científicos (Apêndices C e D).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado para pré-validar um teste sorológico de potência (ES) para vacinas contra a raiva humana, em consonância com outros pesquisadores (KRÄMER et al, 2013). Na década dos anos 2000 e nos últimos oito anos, o número de animais utilizados nos ensaios de atividade para o controle oficial da vacina antirrábica humana no Brasil foi estimado em aproximadamente 26.250 camundongos. O ES utiliza menor número e, obviamente, está associado a menos angústia e sofrimento para os animais, proporcionando redução e refinamento consideráveis. Apenas 15 camundongos são utilizados para a imunização em cada vacina teste e de referência em comparação com EPNIH (n= 48). As perspectivas do ES validado serão de redução de 69% do número de animais. Além disso, um refinamento será obtido com a substituição do desafio ic pela coleta de amostra de sangue sob anestesia e a redução no tempo de execução da prova em pelo menos duas semanas.

Um aspecto importante na tentativa de substituição do EPNIH pelo ES foi a caracterização da resposta imune avaliada pelos títulos de anticorpos frente a morte ou sobrevivência no ensaio de desafio. Estudos anteriores demonstraram que o pico de AN ocorre no 14º dia – correspondendo ao momento do desafio ic com o vírus CVS no EPNIH – momento em que foi realizada a coleta das amostras de sangue utilizadas no RFFITm do ES nesta pesquisa (KRÄMER et al, 2009).

Ao avaliar o esquema vacinal de dose única, ficou demonstrado haver diferença significativa para o esquema de duas doses. Na comparação da diferença entre as médias, duas doses, apresentou melhores resultados em acordo com o encontrado por outros pesquisadores (KRÄMER et al, 2009). Na utilização do esquema vacinal de dose única, também existe a possibilidade de reprovar amostras de vacinas com potência próxima ao limite de aceitação (2,5 UI/dose), aumentando o erro α . Outro fator a ser considerado é que as vacinas são diluídas em série e este procedimento reduz a ação de adjuvantes devido às baixas concentrações após a diluição, o que parece favorecer o esquema vacinal de duas doses que foi o selecionado para ser utilizado no ES (LIU et al, 2012).

Já foi demonstrado também que a via de inoculação pode ter um impacto significativo sobre o sistema imune e resposta à vacinação em camundongos (WUNDERLI et al, 2003; KRÄMER et al, 2009). A Farmacopeia europeia recomenda

a via ip para o EPNIH e a intramuscular ou subcutânea para o ensaio sorológico da vacina veterinária. Contudo, em um estudo realizado com esta vacina, os títulos de AN após vacinação im foram consideravelmente inferiores aos títulos determinados após imunização ip. Por este motivo, vias de administração alternativas não foram avaliadas neste estudo, sendo utilizada a ip como no EPNIH. Isto evitou que mais variáveis interferissem na compreensão da resposta ao esquema vacinal, o que poderia também dificultar sua comparação com os resultados do ensaio tradicional (KRÄMER et al, 2009).

As estimativas das potências das amostras de vacinas no ES foram determinadas com os títulos de AN contra raiva obtidos pelo RFFITm (MOURA et al, 2008). Foram utilizadas, inicialmente, três diferentes abordagens de cálculo para a estimativa da potência nos ES realizados que, posteriormente, foram comparadas com os resultados do EPNIH. O cálculo da potência pela ab-OMS produziu uma melhor concordância entre ES e EPNIH. Esta abordagem juntamente com a ACIP permitiu uma aproximação do ES com o EPNIH quando a interpretação foi baseada em um desfecho quantal indireto com resposta de tudo ou nada (soroconversão ou não soroconversão). Isto foi baseado na recomendação da OMS de 0,5 UI/ mL de título de AN da raiva como o preditor clínico da resposta vacinal (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). Na ab-TAN, o ES pôde ser avaliado como um ensaio indireto quantitativo, onde a potência foi determinada indiretamente comparando as respostas produzidas em escala quantitativa pelo título de AN (GOVINDARAJULU, 2001).

Outro importante fator já mencionado por outros autores são as diferentes leituras dos ensaios: títulos de AN no ES e taxas de sobrevivência no EPNIH (KRÄMER et al, 2013). A esse respeito, embora tenha influenciado claramente nestas abordagens do ES, acrescentamos que o método utiliza a análise de probitos para determinação de potência relativa nas ab-OMS e ab-ACIP, minimizando este efeito. Os resultados obtidos na titulação de AN pelo RFFITm de cada camundongo foram categorizados individualmente em “conforme” e “não conforme” e, assim, foram incluídos no programa computacional para o cálculo da potência como um ensaio indireto quantal.

Para a potência biológica do ES foram propostos dois conjuntos separados de critérios de aceitação: os relativos ao ensaio como um todo e os critérios de aceitação de cada amostra em análise, semelhante ao que ocorre no EPNIH

(FARMACOPEIA, 2010a). Pelo critério de aceitação de cada amostra, uma foi considerada inválida devido à potência não conforme e foi repetida em outro ensaio. No ES ab-TAN, todos os ensaios apresentaram problemas com critérios de aceitação. Nos que apresentaram não paralelismo, foi utilizado o teste estatístico de equivalência no CombiStats® e as inclinações foram consideradas como equivalentes e, conseqüentemente, o não-paralelismo foi satisfatório. Neste ES, três amostras foram inválidas sendo duas devido a potência não conforme ($<2,5\text{UI/dose}$) e uma pelo não-paralelismo mesmo após o teste de equivalência. Na terceira abordagem de determinação da potência, ab-ACIP, duas vacinas foram inválidas devido a potência não conforme e uma outra apresentou não-paralelismo, porém foi aprovada pelo teste de equivalência. Apesar dos ensaios ou amostras inválidas, os resultados foram utilizados nas comparações com o EPNIH. Em todos os ensaios em que foi utilizada a ab-OMS do ES, foram obtidos ensaios válidos e esta abordagem foi escolhida para o estudo de pré-validação.

Todos os fabricantes de vacinas contra a raiva humana aderem às diretrizes da OMS, considerando que vacinas antirrábicas com potência $\geq 2,5\text{ UI/mL}$ se correlacionam com a eficácia clínica, sendo definida como proteção contra doença e morte devido ao desenvolvimento de um título AN equivalente a $0,5\text{ UI/mL}$ (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). Portanto, este mesmo parâmetro pode ser utilizado na concordância dos resultados entre o ES e EPNIH e até mesmo na abordagem de consistência de produção (FITZGERALD et al, 1978; WUNDERLI et al, 1991).

O título AN contra raiva não é o único parâmetro de resposta imune, mas um indicador confiável de proteção imunológica, inclusive sendo utilizado em ensaios clínicos de novas vacinas para a avaliação clínica de vacinação antirrábica e obtenção de licenciamento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). O ES pode prever a potência clínica das vacinas, um requisito referido pelo EPAA (2012).

Uma abordagem moderna para comparar ensaios é a compreensão de que o método substituto não deve ser obrigado a ter uma correlação significativa com o método de referência, uma vez que o EPNIH possui variabilidade inerente. O novo teste deve concordar com a potência clínica da vacina e deve ser capaz de discriminar entre lotes potentes e subpotentes. É por isso que alguns autores se referem a “concordância” em vez de “correlação” (EPAA, 2012), embora muitos

estudos ainda utilizem a correlação como método de análise (KRÄMER et al, 2009; KRÄMER et al, 2013; MORGEAUX et al, 2017).

Para verificar a concordância com a potência clínica das vacinas, foi realizada uma série de análises estatísticas comparando as potências calculadas no ES pelas três abordagens com o EPNIH. As potências foram consideradas estatisticamente semelhantes quando estimadas pela ab-OMS. No ES ab-TAN, os resultados também foram concordantes, porém duas amostras foram não conforme (potência <2,5 UI/ dose). Pela ab-ACIP, não houve diferença significativa entre as amostras, mas duas também apresentaram potências não conforme. Apesar de algumas vacinas não cumprirem os requisitos de potência houve conformidade geral entre os ensaios (FARMACOPEIA, 2010a).

Historicamente, a substituição de um ensaio requer estudos comparativos que demonstrem equivalência estatística entre os dois métodos, mas, como referido anteriormente, estudos de correlação quantitativos demonstrando tal equivalência podem não ser possíveis. Apesar disso, a correlação do ES ab-OMS apresentou a maior concordância com o EPNIH (STOKES et al, 2012). Quando se comparam as potências relativas, obtidas a partir da ES com as do EPNIH, foram observadas algumas diferenças. No entanto, a plena conformidade dos valores absolutos de potência não pode ser esperada devido à alta variabilidade inerente aos ensaios com animais e células (FITZGERALD et al, 1978; BRUCKNER, KIHM, 1986; WEIBER, HECHLER, 1997; KRÄMER et al, 2009; JOELSSON, 2010; RIEDER et al, 2010; SCHROCK, 2012; STOKES et al, 2012; KRÄMER et al, 2013). Apesar disso, os resultados foram altamente correlacionados, conforme sugerido por Stokes e colaboradores (2012). Portanto, os valores aqui encontrados podem ser considerados suficientes e não houve falhas em identificar vacinas potentes como subpotentes. Na ab-TAN, houve uma forte semelhança com o EPNIH, assim como na ACIP. Estes também foram considerados suficientes devido a alta variabilidade dos bioensaios (KRÄMER et al, 2009; STOKES et al, 2012; KRÄMER et al, 2013).

A Relevância do ES na ab-OMS pôde ser demonstrada pela grande sensibilidade, especificidade, exatidão, VPP e VPN, indicando um desempenho perfeito. O coeficiente de correlação (r 0,9267) mostrou alta concordância com EPNIH, como observado por outros pesquisadores para ensaio *in vitro* (Elisa) (PERRIN et al, 1990; GAMOH et al, 1996; GIBERT et al, 2013; MORGEAUX et al, 2017). O ES também apresentou uma correlação maior do que a obtida pelo teste

de fluoroimunoensaio (LIN et al, 2017) e outros testes sorológicos (HENDRIKSEN, 1991; WINSNES et al, 2003; KRÄMER et al, 2009). Pelo coeficiente de Cohen Kappa, adotando-se a tendência de concordância ao invés da correlação entre os resultados (STOKES et al, 2012; SCHIFFELERS et al, 2014), a ab-OMS também apresentou força de concordância perfeita, sendo superior ao ES pela ab-TAN e ACIP.

Embora a comunidade científica reconheça o valor dos ensaios sorológicos para a avaliação da potência de vacinas antirrábicas veterinárias inativadas, algumas preocupações ainda existem em relação à capacidade do ensaio detectar adequadamente os lotes subpotentes. Desta forma, os estudos de validação específicos devem incluir lotes adicionais identificados como subpotentes no EPNIH. Este cuidado também se aplica à vacina de uso humano e, por isso, a capacidade de identificar lotes subpotentes foi explorada nesta pesquisa (STOKES et al, 2012; SCHIFFELERS et al, 2014). Aqui foi demonstrado que o ES foi capaz de detectar lotes de vacinas subpotentes, permitindo a identificação de lotes inadequados para liberação na rede pública de saúde. Esse aspecto é de particular importância no que diz respeito à liberação de lotes de vacinas antirrábicas (KRÄMER et al, 2009).

Pela ab-OMS, todos os resultados foram concordantes entre o ES e EPNIH, ou seja, o método foi capaz de distinguir entre lotes potentes e subpotentes de vacinas e observou-se concordância total com o EPNIH como descrito anteriormente (KRÄMER et al, 2013; MORGEAUX et al, 2017). Nas outras duas abordagens de determinação da potência relativa, duas amostras de vacina íntegras foram reprovadas, porém, todos os resultados das vacinas subpotentes foram concordantes. Diferente do encontrado por Servat e colaboradores (2015), que ao utilizar o teste de vírus neutralização de anticorpo fluorescente (FAVN) houve uma falha entre os lotes subpotentes. Outros grupos encontraram apenas concordância satisfatória para identificar lotes não conformes (CHABAUD-Riou et al, 2017; MORGEAUX et al, 2017). Alguns pesquisadores encontraram índices de sensibilidade variando de 55 a 68% (SERVAT et al, 2015) e de 47 a 90% (KRÄMER et al, 2010), ambos inferiores ao valor observado neste estudo. Nas demais abordagens, o ensaio apresentou boa Sensibilidade, Exatidão e VPN ou ótima Especificidade e VPP (THE UNITED, 2017b). Uma semelhança entre essas pesquisas foi a ocorrência de resultados de potência inválidos, com vacinas antirrábicas de potência satisfatória. Essas vacinas, reconhecidas erroneamente

como subpotentes, estavam diretamente relacionadas ao número de não respondedores nas vacinas teste e as diferenças entre as respostas individuais de anticorpos nos camundongos dos grupos de vacina teste e VacRef, onde houve uma resposta melhor na soroconversão.

Diferenças significativas podem indicar uma mudança no estado imunológico dos camundongos ou em outros aspectos da criação de animais (van der ARK et al, 2000). Animais de alta e baixa resposta e não respondedores foram observados no presente estudo. Os não respondedores foram encontrados, principalmente, em grupos de animais vacinados com doses menores de vacina, como observado anteriormente (KRÄMER et al, 2013). A exclusão de não respondedores pode influenciar o resultado do teste, uma vez que esta falha pode não ser totalmente intrínseca ao animal, mas devido a uma vacina subpotente (KRÄMER et al, 2010). Existe uma lacuna na detecção de verdadeiros não respondedores, levantando questões sobre um dado lote de vacina tendo baixa potência ou sendo o animal não respondedor. Estudos de cinética celular são necessários para complementar e identificar verdadeiros não respondedores, como sugerido por algumas pesquisas (BORDIGNON et al, 2002), determinando assim com segurança, quantos indivíduos podem ser descartados dos cálculos de potência.

O desempenho do ES em diluição única da vacina com as potências determinadas pela ab-OMS e TAN apresentou ótima Sensibilidade e VPN, e boa Especificidade, Exatidão e VPP. A ideal aplicação desta abordagem seria a diluição das vacinas referência e Teste para a potência mínima requerida (2,5 UI/ dose), com base em sua potência declarada e a imunização dos animais com 1/5 da dose humana (1/5 de 0,5 mL = 0,1 mL) (COUNCIL, 2013). Após exclusão de duas amostras aberrantes, o ES apresentou um ótimo desempenho. Testando as vacinas pela a segunda diluição, o ES na ab-OMS apresentou concordância muito boa com o EPNIH e na ab-TAN foi considerada boa. Não observamos resultados inconclusivos conforme descrito anteriormente em ES de diluição única para a vacina antirrábica veterinária (SERVAT et al, 2015). Talvez isso tenha ocorrido devido à configuração daquele ensaio ser diferente da adotada aqui neste experimento, onde as vacinas teste não foram diluídas para conter a potência mínima requerida.

O ρ_c entre o ES e o EPNIH foi de 0,88 para a ab-OMS e 0,70 para a ab-TAN. As correlações 0,93 e 0,75 com Veracidade 0,95 e 0,93, esses valores foram considerados satisfatórios.

Na análise da Precisão do ES ab-OMS e TAN pelo ρ_c , observou-se uma concordância satisfatória e o ensaio foi capaz de identificar lotes potentes e subpotentes. Ficou comprovada uma maior concordância e correlação do ES ab-OMS com o EPNIH (Fig. 6.1). Na comparação com o ES ab-TAN ocorreu uma maior dispersão dos pares de dados e, conseqüentemente, houve maior afastamento da reta de correlação das potências com a reta de concordância de Lin (Fig. 6.2).

A Relevância do ES pôde ser demonstrada pelo desempenho perfeito (THE UNITED, 2017b). O coeficiente de Cohen Kappa indicou grande concordância do ES com o EPNIH (STOKES et al, 2012; SCHIFFELERS et al, 2014). A Exatidão do ES de 100% obtida do cálculo de Sensibilidade foi maior do que a previamente encontrada, com IC comparável ao Elisa (CHABAUD-RIOU et al, 2017). No presente estudo, o ES foi realizado como uma adaptação direta do protocolo EPNIH, incluindo a faixa de dose, mas apenas cinco camundongos foram utilizados por diluição. Os IC foram mais amplos do que no EPNIH, diferindo daqueles encontrados por outros autores (KRÄMER et al, 2013). Este resultado mostra a necessidade de ajustar a faixa de dose (diluições) a ser utilizada no ES, a fim de melhorar a similaridade das respostas entre as vacinas de referência e teste, uma suposição básica para ensaios biológicos. Uma vez que a prova de conceito foi estabelecida, o método poderá ser transferido para pelo menos um laboratório adicional com a adoção de uma quarta dose que poderia resolver esse ajuste.

Esses IC mais amplos também podem ser explicados pela variação dentro do grupo de animais no ES. Alguns camundongos desenvolveram títulos mais altos do que outros no mesmo grupo e no grupo VacRef, como observado em estudos anteriores (KRÄMER et al, 2009). Outro fator determinante para os IC mais amplos, provavelmente, foi devido ao padrão de referência utilizado no ES ser calibrado no EPNIH. Portanto, a calibração prévia dos padrões no próprio ES é altamente recomendada para um estudo de validação futuro.

A Confiabilidade é um pré-requisito para a validade dos ensaios sorológicos, devido à sua capacidade de estimar a atividade de proteção da vacina, o que foi prontamente obtido com o ES proposto (HENDRIKSEN, 1995). A Precisão do ensaio avaliada pelos coeficientes geométricos de variação inter-ensaio foi de cerca de

30%, considerado adequado, indicando o bom desempenho do ES (KOSTENSE et al, 2012). Pesquisadores relataram anteriormente precisão intra-ensaio variando de 6,1 a 35,5% e inter-ensaio de 8,6 a 37,6% por laboratório para um teste de potência sorológica para Pertussis (van der ARK et al, 2000). Valores semelhantes foram encontrados para o ES, 31,99 - 31,65% e 31,82% para variação intra e inter-ensaio, respectivamente.

Um estudo foi realizado para determinar o limite inferior de imunogenicidade à GLPTN para melhor compreensão da Sensibilidade dos ensaios sorológicos baseados na neutralização viral revelada em cultivo celular. Neste estudo calculou-se a correlação entre o teor de GLPTN, medido pelo kit Elisa-D1 e o título de AN, avaliado pelo RFFITm. Na revisão de AN individuais dos camundongos, respondedores anormais foram identificados em três diferentes diluições e esses resultados foram removidos dos cálculos. Os sete lotes de vacinas utilizados neste estudo continham concentrações de GLPTN diferentes, variando de 3,3 a 6,75 UI/ mL ou 88,07 a 132,38 ng/ mL. As médias dos títulos AN foram emparelhadas com o conteúdo GLPTN, a concentração de soroconversão efetiva (0,0138 UI/ mL, 0,388 ng/ mL de GLPTN) foi identificada e os resultados foram diretamente correlacionados por regressão linear.

Os coeficientes de correlação entre o teor de GLPTN e a média dos títulos de AN foram considerados adequados (r 0,758), superiores aos observados por outros grupos de pesquisa que encontraram uma correlação fraca (SMITH et al, 2013). O mesmo foi observado para a BR014, cuja regressão mostrou que os resultados também foram correlacionados (r 0,913 e 0,921). Esses dados demonstraram uma correlação positiva e forte entre a resposta de anticorpos e a quantidade de antígeno na vacina, como revelado no estudo sobre vacinas contra furunculose em salmão do Atlântico, cuja correlação de Pearson foi de r 0,82 (ROMSTAD et al, 2013). No mesmo estudo, existe também uma estreita correlação entre a resposta de anticorpos e a proteção contra o desafio. Esta é outra semelhança com este estudo porque acreditamos que os baixos títulos de AN não protegem os animais de um desafio ic como descrito anteriormente (FITZGERALD et al, 1978; WUNDERLI et al, 1991) e aqui foi observado que quanto menor o conteúdo de antígeno pior é a soroconversão. Os mesmos resultados de correlação positiva entre a resposta de anticorpos de fórmulas vacinais inativadas com H9N2 tanto em frangos comerciais como em frangos livres de patógenos específicos (*Specific pathogen free - SPF*)

também foram relatados (KILANY et al, 2016). A resposta sorológica de frangos *SPF* foi medida após a imunização com vacinas inativadas da doença de Newcastle e o conteúdo das vacinas foi altamente correlacionado com os títulos de anticorpos (r 0,87 e 0,97), semelhantes aos nossos achados (MAAS et al, 2003).

Em um ensaio clínico envolvendo voluntários adultos em que foram testadas vacinas antirrábicas, as respostas de anticorpos mostraram uma correlação entre o conteúdo antigênico da vacina e o título de AN semelhante ao observado em camundongos nesta pesquisa (FERGUSON & SCHILD, 1982). Em outro estudo com bovinos (SCHUMACHER et al, 1989; PIZA et al, 2002), as respostas de anticorpos mostraram uma correlação entre o conteúdo antigênico da vacina e o título de AN semelhante ao observado em camundongos no presente estudo. Os autores relataram uma correlação positiva entre as quantidades de GLPTN presentes nos lotes de vacinas e os títulos de AN, no entanto, nenhuma correlação foi detectada entre os níveis de GLPTN e a potência determinada pelo teste padrão NIH.

Essa observação foi semelhante ao presente estudo (aqui se refere à correlação entre o conteúdo de GLPTN com a potência). Para um estudo de validação futuro do ES, será extremamente importante incluir um maior número de amostras para avaliar melhor a correlação da potência com o conteúdo de GLPTN e o título de AN. Além disso, estudos de validação deverão incluir amostras potentes, subpotentes e limítrofes classificadas pelo EPNIH, para analisar a Sensibilidade do ES. Desta forma, será possível avaliar a metodologia e propor melhorias para o ensaio (MILNE & BUCHHEIT, 2012).

Evidências preliminares sugerem que os testes sorológicos são úteis para prever a potência das vacinas antirrábicas, estimando a imunogenicidade. Isto mostra uma vantagem do ES, que mede diretamente o título de AN e a imunogenicidade da vacina, o que pode ser conveniente na busca de substituição do EPNIH. O RFFITm foi tão eficaz quanto o EPNIH na estimativa da capacidade de um lote de vacina em induzir proteção contra a infecção por VR, como reconhecido por outros pesquisadores (GIBERT et al, 2013). Esta mesma hipótese também já foi levantada anteriormente, utilizando outros ensaios para avaliar a imunogenicidade, quantificando GLPTN (SMITH et al, 2013).

Os métodos *in vitro* medem anticorpos de ligação, enquanto testes *in vivo*, como RFFITm, medem AN e revelam diretamente imunidade humoral, sendo mais seguros. Hoje, os testes de Elisa e imunodifusão radial simples são recomendados

para determinar o conteúdo de antígeno na formulação de lotes de vacina humana, mas o EPNIH é mantido na avaliação de potência (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007; FARMACOPEIA 2010a; COUNCIL, 2015). Embora alguns autores reconheçam que o Elisa foi desenvolvido para avaliar o conteúdo de GLPTN e determinar a potência de vacinas inativadas, eles refletem apenas a reatividade do antígeno *in vitro* e são inadequados para avaliar a imunogenicidade *in vivo* (LIU et al, 2012).

Esse cenário reforça a necessidade de investir e validar testes de potência sorológicos com potencial para substituir o EPNIH, em consonância com outros pesquisadores (KRÄMER et al, 2013). Não está bem estabelecido se modelos de camundongos poderiam prever exatamente o efeito da vacina observada em humanos, no entanto, esta abordagem tem sido usada por mais de 60 anos, como preconizado pelo EPNIH. Também é possível que o teste tenha limitações e não possa prever com exatidão a eficácia das vacinas antirrábicas em seres humanos. No entanto, já foi demonstrado que a indução de AN por uma vacina é uma função da concentração de antígeno presente em uma dada diluição de vacina no EPNIH (DIAZ et al, 1990), conforme observado aqui. Isso permite inferir que esse tipo de teste pode ser adequado para verificar a consistência da produção, sendo indicativo da eficácia da vacina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007; COUNCIL, 2013).

Além da redução considerável do número de animais, combinando esta abordagem com o GMP e outros sistemas de qualidade, juntamente com a análise estatística em cada etapa do processo de produção, os testes sorológicos na abordagem de consistência podem ser aplicados na liberação do lote. Assim, será possível obter qualidade, reduzir e refinar os testes *in vivo* em produtos acabados, como indicado em outros estudos similares (KREEFTENBERG, 2002; ARCINIEGA & SIROTA, 2012). A vacina contra a raiva é o único produto farmacêutico em que a dose mínima não foi definida, ou como já apontado por outra pesquisa (DODET, 2011), quanto componente ativo deve ser injetado no paciente. Isso se torna um problema para o controle dos esquemas de vacina e para a avaliação da soroconversão do paciente. A OMS recomenda a mesma potência (2,5 UI) para todas as vacinas de cultura de células, que podem ser aplicadas por via im ou intradérmica, mas os volumes de dose são fixos apesar da potência do lote de vacina variar. Por esta razão, os resultados aqui apresentados também podem contribuir neste campo.

Os princípios dos 3R têm sido reconhecidos por comitês de ética animal como cruciais para consideração de protocolos de pesquisa (IN VITRO, 2000). No desenvolvimento dos métodos alternativos para a determinação da potência de vacinas, o objetivo final é substituir os animais. A transição imediata para um teste *in vitro* é tecnicamente difícil e, quando possível, demorada. No entanto, o sucesso em intercalar a melhoria do bem-estar animal pode ser realizado pelo desenvolvimento de métodos que refinem e reduzam a dor e o desconforto dos animais (COUNCIL, 1996; STOKES, 2000; STOKES, 2002). O ES atende aos princípios dos 3R promovendo redução e refinamento consideráveis. O ensaio não elimina completamente a utilização de animais, porém atende a parte dos objetivos, reduzindo a quantidade de animais em 69% e minimizando, consideravelmente, a dor e a angústia ao suprimir o desafio ic. Outro aspecto importante é a redução do tempo de prova em comparação com o EPNIH (duas versus quatro semanas) em acordo ao sugerido e obtido por outros pesquisadores (ARK et al, 2000; CASEY et al, 2011; STOKES et al, 2012; KRÄMER et al, 2013).

Para lidar com os obstáculos do processo de validação, várias sugestões já foram feitas. A principal delas é utilizar uma estratégia de concordância em vez de correlação completa com o EPNIH, onde a aprovação regulatória e implementação do método alternativo podem ser obtidas após uma correlação de aprovação/reprovação por meio de análise de lotes subpotentes (STOKES et al, 2012; SCHIFFELERS et al, 2014). Por este motivo, a avaliação de lotes subpotentes foi utilizada como ferramenta durante esta fase de pré-validação do ES. Ao mesmo tempo, autoridades reguladoras internacionais também encorajam os laboratórios produtores a considerar evidência de CP durante o processo de validação (STOKES et al, 2012).

6 CONCLUSÃO

- O ES é um modelo preciso, específico e sensível para estimar a potência e confirmar a conformidade com as especificações das vacinas antirrábicas para uso humano, sendo capaz de distinguir entre lotes de vacinas potentes e subpotentes.
- A concordância entre a potência correspondente no EPNIH demonstra a Relevância e a Confiabilidade do ES utilizando RIFFTm.
- O ES analisado emprega diretamente o princípio dos 3R, uma vez que promove o bem-estar animal, e também reduziu o tempo de avaliação da potência de vacinas contra raiva humana, acelerando a liberação dos lotes e garantindo a eficácia das vacinas.
- Existe uma correlação positiva e linear entre o teor de GLPTN e o título AN.
- O ES utilizando RIFFT tem potencial para verificar a conformidade dos lotes de vacinas antirrábicas de uso humano com as especificações requeridas, e ser um candidato para futuras pesquisas e validação.
- O ES é rápido, eficiente e de acordo com a imunogenicidade induzida em camundongos e, portanto, pode ser recomendado para validação como um teste de potência para substituir o EPNIH.

Como perspectivas, espera-se um refinamento e uma redução consideráveis no uso de animais, e o método poderá ser utilizado para controlar a qualidade de vacinas inativadas contra raiva humana em laboratórios de controle oficial e pelos fabricantes.

REFERÊNCIAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Rabia. **FALTOU O TÍTULO DA PARTE**. In: ACHA, P.N.; SZYFRES, B. (eds). **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud. Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, 2003. p. 351–383.

ANALYSIS of biological assays <1034>. In: THE UNITED States Pharmacopoeia 35. National Formulary 30. Rockville: U.S. Pharmacopeia, 2017d. <[http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/2010-03-25_1034_PF36\(4\)_w_line_numbers.pdf](http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/2010-03-25_1034_PF36(4)_w_line_numbers.pdf)> [acesso 15.05.17].

APPLICATION of the 3RS And the consistency approach for improved vaccine quality control. In: THE VACCINES CONSISTENCY APPROACH WORKSHOP, 2012, Arcachon, France. France: European Partnership For Alternative Approaches, 2012. Disponível em: <https://circabc.europa.eu/sd/a/6cfc6e14-4c81-4981-a424-5b51b982da1d/flash-report-vaccines-workshop-october-2012_en.pdf>. Acesso em: 12 set. 2014.

ARCINIEGA, J.; SIROTA, L.A. Potential application of the consistency approach for vaccine potency testing. **Developments in biologicals**, v.134, p. 135-139, 2012.

ARKO, R.J.; WIKTOR, T.J.; SIKES, R.K. The antibody-binding test for vaccine potency. In: **Laboratory Techniques in Rabies**. 3. ed. Geneva: World Health Organization, 1973. p. 265-267.

van der ARK, A. et al The Pertussis Serological Potency test collaborative study to evaluate replacement of the mouse protection test. **Biologicals**, v. 28, p. 105-118, 2000.

ASSAY of tetanus vaccine (adsorbed). In: THE EUROPEAN Pharmacopoeia. Strasbourg, France: Council of Europe, 1996. Cap. 2.7.8.

ATANASIU, P. et al Etude morphologique du virus rabique des rues en culture de tissue. **CR Academy Science**, v.256, n.3219. 1963.

BARTH, R.; DIDERRICH, G.; WEINMANN, E. NIH test, a problematic method for testing potency of inactivated rabies vaccine. **Vaccine**, v.6, n. 4, p. 369-377, 1988.

BARTH, R. et al Validation of an in vitro assay for the determination of rabies antigen. **Developments in Biological Standardization**, v.64, p. 87-92, 1986.

BENCHIMOL, J.L. **Dos micróbios aos mosquitos: febre amarela e a revolução pasteuriana no Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ/UFRJ, 1999. 500 p.

BENMANSOUR, A. et al Antigenicity of rabies virus glycoprotein. **Journal of Virology**, v.65, p. 4198-4203, 1991.

BIOLOGICAL assay validation <1033>. In: THE UNITED States Pharmacopoeia 35. National Formulary 30. Rockville: U.S. Pharmacopeia, 2017c. <[http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/2010-03-25_1033_PF36\(4\)_w_line_numbers.pdf](http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/2010-03-25_1033_PF36(4)_w_line_numbers.pdf)> [acesso 15.05.17].

BIOLOGICAL STANDARDISATION PROGRAMME. **Background & Mission**. Disponível em: <https://www.edqm.eu/en/Biological-Standardisation-Programme-mission-60.html>. Acesso em: 08 ago. 2018.

BORDIGNON, J. et al Calculating rabies virus neutralizing antibodies titres by flow cytometry. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.44, n. 3, 151-154, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Extrato de Cooperação Técnica. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 jan. 2012a. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=3&pagina=122&data=18/01/2012>>. Acesso em: 25 jan. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa nacional de profilaxia da raiva**. Brasília. 1973.

BRASIL. Constituição da República Federativa do Brasil, de 05 de outubro de 1988a. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 05 out. 1988. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm>. Acesso em: 03 fev. 2016.

BRASIL. Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação

da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 jul. 2009. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6899.htm>. Acesso em: 25 jan. 2016.

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**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 1990. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L8080.htm>. Acesso em: 21 jan. 2016.

BRASIL. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 jan. 1999. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L9782.htm>. Acesso em: 21 jan. 2016.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008b. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 09 out. 2008. Disponível em: <<http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/310555/Legislacao.html>>. Acesso em: 21 jul. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 228, de 25 de outubro de 1988b. Instruções referentes ao Controle da Produção e Comercialização de Vacinas e Soro Anti-rábico para uso veterinário. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 31 out. 1988. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=detalharAtoArvore&tipo=POR&numeroAto=00000228&seqAto=000&valorAno=1988&orgao=MAPA&codTipo=&desltem=&desltemFim=#>>. Acesso em: 03 fev. 2016.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Portaria nº 491, de 3 de julho de 2012b. Institui a Rede Nacional de Métodos Alternativos - RENAMA e sua estrutura no âmbito do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI, que será supervisionada por um Conselho Diretor. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 05 jul. 2012. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=19&data=05/07/2012>>. Acesso em: 25 jan. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância em Saúde. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_899_2003_COMP.pdf/ff6fd6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b. Acesso em: 15 maio 2017.

_____. Resolução nº 73, de 21 de outubro de 2008a. 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. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/res0073_21_10_2008.html>. Acesso em 23 dez. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde [on line] Brasília, Brasil, 2006. Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=25213>. Acesso em 23 dez. 2006.

_____. **Normas técnicas de profilaxia da raiva humana**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014a. 64p.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução Normativa nº 30, de 2 de fevereiro de 2016. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238684.pdf>. Acesso em: 03 jan. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/raiva/situacao-epidemiologica>. Acesso em: 22 out. 2018.

BRASIL. Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA). 2014b. Disponível em: <<http://renama.org.br/>>. Acesso em: 03 jan. 2016.

BRUCKNER, L.; CUSSLER, K.; HALDER, M.; BARRAT, J.; CASTLE, P.; DUCHOW, K.; et al Three Rs approaches in the quality control of inactivated rabies vaccines. **Alternatives to Laboratory Animals**, v.31, p. 429-454, 2003.

BRUCKNER, L.; KIHM, U. Alternatives for potency testing of veterinary vaccines: rabies vaccine as a model. **Developments in Biological Standardization**, v.64, p. 93-97, 1986.

CARINI, A. Sur une grande epizootia de rage. **Annales de l'Institut Pasteur**, v.11, p. 843-846, 1911.

CASEY, W. et al Improving animal welfare and reducing animal use for human vaccine potency testing: state of the science and future directions. **Procedia in Vaccinology**, v.5, p. 33-46, 2011.

CHABAUD-RIOU, M. et al G-protein based ELISA as a potency test for rabies vaccines. **Biologicals**, v.46, p. 124-129, 2017.

COLLIER, L; OXFORD, J. **Human virology**: a text for students of medicine, dentistry and microbiology. 2. ed. New York: Oxford University Press, 2000. 284 p.

CONSALES, C.A.; BOLZAN, V.L. Rabies Review: immunopathology, clinical aspects and treatment. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**. v. 13, n. 1, p. 5–38, 2007.

COSTA, W.A.; ÁVILA, C.A.; VALENTINE, E.J.G.; REICHMANN, M.L.A.B.; CUNHA, R.S.; GUIDOLIN, R.; PANACHÃO, M.R.I; OMOTO, T.M.; BOLZAN, V.L. **Profilaxia da Raiva humana**. 2. ed. São Paulo, Instituto Pasteur, 2000. (Manuais, 4).

DAVIES, M.C. et al The electron microscopy of rabies virus in cultures of chicken embryo tissues. **Virology**, v.21, p. 642-651. 1963.

DESIGN and analysis of biological assays <111>. In: THE UNITED States Pharmacopoeia 35. National Formulary 30. Rockville: U.S. Pharmacopeia, 2017a. <<http://www.usp.org/meetings-courses/workshops/past-uspworkshops/usp-bioassay-guidance-chapters>>. Acesso em: 15 maio 2017.

DEVELOPMENT and design of biological assays <1032>. In: THE UNITED States Pharmacopoeia 35. National Formulary 30. Rockville: U.S. Pharmacopeia, 2017b. <[http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/2010-03-25_1032_PF36\(4\)_w_line_numbers.pdf](http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/2010-03-25_1032_PF36(4)_w_line_numbers.pdf)>. Acesso em: 15 maio 2017.

DIAZ, A.M.O. et al Rabies Reference Vaccine for Use as a Regional Standard for Latin America and the Caribbean Countries. **Biobgicals**, v.18, p. 281-287, 1990.

DIETZSCHOLD, B. et al Structural and immunological characterization of a linear virus neutralizing epitope of the rabies virus glycoprotein and its possible use in a synthetic vaccine. **Journal of Virology**, v.64, p. 3804-3809, 1990.

DIMMOCK, N.J.; EASTON, A.J.; LEPPARD, K.N. **Introduction to modern virology**. 5 ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2001.

DODET, B. Antigen content versus volume of rabies vaccines administered intradermally. **Biologicals**, v.39, p. 444-445, 2011. doi: 10.1016/j.biologicals.2011.08.002.

EDUARDO, M.B.P. **Vigilância Sanitária**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 1998. 465 p. (Série Saúde & Cidadania, v. 8). Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/Institucional/historia.htm>>. Acesso em: 23 dez. 15.

EKSTROM, F.A. Rabies epidemic at Stockholm in 1824. **Medical Gas**, v. 6, p. 689, 1830.

VACINA Raiva Inativada. In: FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010a. v. 2, p. 1366-1368.

FERGUSON, M. Single radial immunodiffusion test for the determination of the glycoprotein content of inactivated rabies vaccines. In: MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory Techniques in Rabies**, 4. ed. Geneva: WHO, 1996. p. 378-382.

FERGUSON, M.; SEAGROATT, V.; SCHILD, G.C. A collaborative study on the use of single radial immunodiffusion for the assay of rabies virus glycoprotein. **Journal of Biological Standardization**, v.12, p. 283-294, 1984.

FERGUSON, M.; SCHILD, G.C. A Single-Radial-Immunodiffusion Technique for the Assay of Rabies Glycoprotein Antigen: Application for Potency Tests of Vaccines Against Rabies. **The Journal of general virology**, v.59, p. 197-201, 1982.

FOURNIER-CARUANA, J. et al Inactivated rabies vaccine control and release: use of an ELISA method. **Biologicals**, v.31, p. 9-16, 2003.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics: guidance for industry. EUA, 2015. Disponível em:

<<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm386366.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2017.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Ética em pesquisa envolvendo animais. Disponível em: <<http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/etica-em-pesquisa-com-animais>>. Acesso em: 25 jan. 2016a.

FITZGERALD, E.A. et al Use of the antibody assay in immunized mice for the determination of rabies vaccine potency. **Developments in Biological Standardization**, v.40, p. 183-186, 1978.

FLECKNELL, P. Replacement, reduction and refinement. **Alternatives to Animal Experimentation**, v.19, p. 73-78. 2002.

FLEMING, G. **Rabies and hydrophobia**: their history, nature, causes, symptoms, and prevention. London: Chapman and Hall, 1872.

FUENZALIDA, E.; PALACIOS, R. Un método mejorado en la preparación de la vacuna antirábica. **Boletín del Instituto de Bacteriología de Chile**, v.8, p. 3-10, 1955.

GAMOH, K.; SENDA, M.; ITOH, O.; MURAMATSU, M.; HIRAYAMA, N.; KOIKE, R.; et al Use of ELISA for in vitro potency test of rabies vaccines for animal use. **Biologicals**, v.24, p. 95-101, 1996.

GERSTL, F.; VOGEL, I. Is the NIH mouse potency test replaceable by the single radial immunodiffusion test? In: WHO. **Progress in rabies control**. Wells Medical, 1988. p. 311-314.

GIBERT, R. et al A relevant in vitro ELISA test in alternative to the in vivo NIH test for human rabies vaccine batch release. **Vaccine**, v.31, p. 6022-6029, 2013.

GOVINDARAJULU, Z. **Statistical techniques in bioassay**. 2. ed. Switzerland: Karger, 2001. p. 234.

HABEL, K. Habel test for potency. In: MESLIN F.-X.; KAPLAN M.M.; KOPROWSKI H. **Laboratory Techniques in Rabies**. 4. ed. Geneva: WHO, 1996. p. 374-377.

HAUPT, H.; REHAAG, H. A Raiva epizoótica nos rebanhos de Santa Catarina. **Boletim. Sociedade Brasileira de Medicina Veterinaria**, v.2, p. 36, 1925.

HENDRIKSEN, C.F. Alternatives for animal testing. **Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde**, v.135, n. 41, p. 1896-1900, Oct 12, 1991.

HENDRIKSEN, C.F.M. Development, Validation and Acceptance of Alternative Methods in the Quality Control of Vaccines: A Case Report. **Toxicology in Vitro**, v.9, n. 6, p. 815-819, 1995.

HENDRIKSEN, C.F.M. Towards eliminating the use of animals for regulatory required vaccine quality control. **Alternatives To Animal Experimentation**, v.23, p. 187-191, 2006.

HENDRIKSEN, C.F.M. Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. **Expert Review of Vaccines**, v.8, n. 3, p. 313-322, Mar, 2009.

HEDRICH, H.J.; BULLOCK, G. **The Laboratory Mouse**. London: Elsevier Academic Press; 2004.

HUMMELER, K.; KOPROWSKI, H.; WIKTOR, T.J. Structure and development of rabies virus in tissue culture. **Journal of Virology**, v.1, p. 152. 1967.

HUMMELER, K.; TOMASSINI, N.; SOKOL, F.; KUWERT, E.; KOPROWSKI, H. Morphology of the Nucleoprotein Component of Rabies Virus. **Journal of Virology**, v.2, n.10, p. 1191-1199. 1968.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **ICTV 9th Report (2011)**. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/201/rhabdoviridae>. Acesso em: 01 set. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DA QUALIDADE EM SAÚDE. **Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos – BraCVAM**. Disponível em: <https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=1188&Itemid=214>. Acesso em: 25 jan. 2016b.

_____. **Portaria 02/2015**, Atualizar a Portaria nº 32/2014 que define os parâmetros para emissão dos Laudos de Análise (análises de orientação), a serem utilizados nos imunobiológicos, referentes a prestação de serviço ao Programa Nacional de

Imunização, coordenado pela Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. 2015. Rio de Janeiro, 2014.

_____. **POP. 65.3430.017**: estabelecimento de vacina de referência contra raiva. Rio de Janeiro, 2016.

_____. **POP 65.3430.018**: ensaio de potência para vacina contra a raiva. Rio de Janeiro, 2017a.

_____. **POP 65.3430.015**: produção e controle da qualidade de vírus rábico fixo semente e de trabalho. Rio de Janeiro, 2017b.

_____. **POP: 65.3430.029**: ensaio de potência “in vitro” para soro antirrábico. Rio de Janeiro, 2017c.

_____. **Relatório de atividades institucionais 2001-2004**. Rio de Janeiro, 2005.

INSTITUTO PASTEUR DE SÃO PAULO. **Isntituto Pasteur**: histórico. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/instituto-pasteur/quem-somos/historico>>. Acesso em: 01 set. 2017.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **ICH Harmonised tripartite guideline**: stability testing of Biotechnological/Biological products.1995.

_____. **ICH harmonised tripartite guideline**: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products Q6B. 1999.

_____. **ICH harmonised tripartite guideline**: validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). 2005a. 17p.

_____. **ICH-Q9 Quality Risk Management**. 2005b.

_____. **ICH-Q10 Pharmaceutical Quality System**. 2008.

_____. **ICH-Q8 (R2) Pharmaceutical Development**. 2009.

IN VITRO TESTING INDUSTRIAL PLATFORM. **The Role of an Industrial Platform in the area of in vitro testing**. 2000. Disponível em: <www.ivtip.org/publications>. Acesso em: 21 jul. 2014.

JALLET, C. et al Chimeric lyssavirus glycoproteins with increased immunological potential. **Virology Journal**, v.73, p. 225–233, 1999.

JOELSSON, D. **A Practical Guide to Design of Experiments (DOE) for Assay Developers**. 2010. Disponível em: <http://www.potencyassay.com/wp-content/uploads/2010/06/DOE_for_assay_developers_Ch1_Rev-1.0.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2015.

JONES, C.; CURIE, F. Control of components of bacterial polysaccharide vaccines by physical methods. **Biologicals**, v.19, p. 41-47, 1991.

de KAPPELLE, I.S. et al Collaborative Study on Test Systems to Assess Toxicity of Whole Cell Pertussis Vaccine. **Biologicals**, v.25, p. 41–57, 1997.

KAPLAN, M.M. Safety precautions in handling rabies virus. In: MESLIN F.-X.; KAPLAN M.M.; KOPROWSKI H. **Laboratory Techniques in Rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 3-8.

KILANY, W.H. et al A Dose-Response Study of Inactivated Low Pathogenic Avian Influenza H9N2 Virus in Specific-Pathogen-Free and Commercial Broiler Chickens Walid H. **Avian diseases**, v.60, p. 256-261, 2016. doi: <https://doi.org/10.1637/11143-050815-Reg>.

KOPROWSKI, H. The virus – Overview. In: Baer GM, ed. **The natural history of rabies**. 2. ed. Boston: CRC Press; 1991, p. 27-29.

KURZ, J. et al Comparative studies of two potency tests for antirabies serum: neutralization test in mice (MNT) and rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT). **Developments in Biological Standardization**, v.64, p. 99-107, 1986.

KOSTENSE, S. et al Validation of the Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test for Rabies Virus-Neutralizing Antibodies in Clinical Samples. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, n. 7, p. 3524–3530, 2012.

KRÄMER, B. et al The rapid fluorescent focus inhibition test is a suitable method for batch potency testing of inactivated rabies vaccines. **Biologicals**, v.37, p. 119-26, 2009.

KRÄMER, B. et al Collaborative study for validation of a serological potency assay for rabies vaccine (inactivated) for veterinary use. **Pharmeuropa Bio and Scientific Notes**, v.2, p. 37-55, 2010.

KRÄMER, B. et al A multi-dose serological assay suitable to quantify the potency of inactivated rabies vaccines for veterinary use. **Biologicals**, v.41, p. 400-406, 2013.

KREEFTENBERG, J.G. Consistency testing of diphtheria and tetanus to replace potency testing for lot release. **Developments in Biologicals**, v.111, p.291-298, 2002.

LIN, G. et al A time-resolved fluoroimmunoassay to assay the rabies virus glycoprotein: application for estimation of human rabies vaccine potency. **Scientific reports**, v.7, n. 7288, p. 1-9, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-07687-7.

LIU, Y. et al A semi-quantitative serological method to assess the potency of inactivated rabies vaccine for veterinary use. **Virologica Sinica**, v.27, n. 4, p. 259-264, 2012. doi: 10.1007/s12250-012-3260-y.

MAAS, R.A. et al Correlation of haemagglutinin-neuraminidase and fusion protein content with protective antibody response after immunisation with inactivated newcastle disease vaccines. **Vaccine**, v.21, p. 3137-3142, 2003. doi: [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(03\)00249-4](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(03)00249-4).

MANNING, S.E. et al Human rabies prevention--United States, 2008: recommendations of the Advisory Committee on immunization practices. **MMWR. Recommendations and Reports**, v.57, n. RR-3, p. 1-28, 2008.

MARKUS, H.L.; JOBIM, G.O.; MOURA, M.C.L. Vacina anti-rábica tipo "Fuenzalida" modificada. (Cinco anos de produção e observações). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.13, p.114-120, 1971.

MASSONE, F. **Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas**. 6. ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2011.

MATSUMOTO, S. Electron microscope studies of rabies virus in mouse brain. **Journal of Cell Biology**, v.19, p. 565-591. 1963.

MATTOS, C.A.; MATTOS, C.C.; RUPPRECHT, C.E. Rhabdoviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. editors-in-chief. GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. associate editors. **Field's Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. cap. 39. p.1245-78.

METZ, B. et al Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. **Vaccine**, v. 20, p. 2411-2430, 2002.

MIOT, H.A. Assessing normality of data in clinical and experimental trials. **Jornal Vascular Brasileiro**, v.16, n. 2, p. 88-91, Apr-Jun, 2017. DOI <http://dx.doi.org/10.1590/1677-5449.041117>.

MILNE C. **Report of the annual meeting 2007 of the CA/OMCLs involved in the control of immunological veterinary medicinal products in Prague**. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care; 2007.

MILNE, C.; BUCHHEIT, K.H. EDQM's 3R activities in the field of quality control of vaccines. **Alternatives to animal experimentation Proceedings**, v.1/12, Proceedings of WC8, p. 65-69, 2012.

MORGEAUX, S. et al Replacement of in vivo human rabies vaccine potency testing by in vitro glycoprotein quantification using ELISA – Results of an international collaborative study. **Vaccine**, v.35, p. 966–971, 2017.

MORIKAWA, V.M. et al Cat infected by a variant of bat rabies virus in a 29-year disease-free urban area of southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, n. 2, p. 255-256, 2012.

MOURA, W.C. et al Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study. **Journal of Virological Methods**, v.54, p. 7-13, 2008.

MOURA, W.C. **Aplicação do conceito dos Três Rs nos ensaios de controle da qualidade de imunobiológicos para Raiva**. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2009.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT..
Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment nº 34. Paris, 2005.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Sistema de informação epidemiológica. **Panaftosa**. Brasil, 2017. Disponível em: <<http://siepi2.panaftosa.org.br/Export.aspx>>. Acesso em: 22 ago. 2017.

PARREIRAS, H.; FIGUEIREDO, P. A epizootia de Biguaçu (nota preliminar). **Brasil Médico**, v.5, p. 71-74. ano XXV, 1911.

PASTEUR, L. Resultats de l'application de la methode pour prevenir la rage apres morsure. **CR Academy Science**, v.102, n.459, 1886.

PAUMGARTTEN, F.J.R. et al Comparison of five methods for the determination of lethal dose in acute toxicity studies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, S.P., v. 22, p. 987-991, 1989.

PAWAN, J.L. Rabies in the vampire bat of Trinidad, with special reference to the clinical course and latency of infection. **Annals of Tropical Medicine**, v.30, p. 401-422. 1936.

PELTZMAN, S. An Evaluation of Consumer Protection Legislation: The 1962 Drug Amendments. **The Journal of Political Economy**, v.81, n. 5, p. 1049-1091, 1973.

PERRIN, P.; LAFON, M.; SUREAU, P. Enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA) for the determination of glycoprotein content of rabies vaccines. In: Meslin F-X, Kaplan M-M, Koprowski H, editors. **Laboratory Techniques in Rabies**. Geneva: WHO, 1996. p. 383–388.

PERRIN, P.; MORGEAUX, S.; SUREAU, P. In vitro rabies vaccine potency appraisal by ELISA: advantages of the immunocapture method with a neutralizing antiglycoprotein monoclonal antibody. **Biologicals**, v.18, p.321-330, 1990.

PIZA, A.T.; PIERI, K.M.S.; LUSA, G.M.; CAPORALE, G.M.M.; TERRERAN, M.T.; MACHADO, L.A.; ZANETTI, C.R. Effect of the Contents and Form of Rabies Glycoprotein on the Potency of Rabies Vaccination in Cattle. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n. 2, p. 265-268. March 2002.

PRESCOTT, L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. **Microbiology**. 3. ed. Boston: Wm. C. Brown Publishers, 1996.

PRESGRAVE, O.A.F. The Need for the Establishment of a Brazilian Centre for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM). **Alternatives to Laboratory Animals**, v.36, p. 705-708, 2008.

RABIES vaccine (inactivated) for veterinary use. In: THE EUROPEAN Pharmacopoeia. 8.0. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2013.

RABIES vaccine for human use prepared in cell cultures. In: THE EUROPEAN Pharmacopoeia. 8.2 ed. Strasbourg: Council of Europe, 2015, p. 3952-3954. Cap. 07/2014:0216.

RIEDER, N. et al The Roles of Bioactivity Assays in Lot Release and Stability Testing. **BioProcess International**, v.8, n. 6, p. 33-42, 2010.

ROMSTAD, A.B. et al Antibody responses correlate with antigen dose and in vivo protection for oil-adjuvanted, experimental furunculosis (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*) vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and can be used for batch potency testing of vaccines. **Vaccine**, v.31, p. 791-796, 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.069>.

ROOIJAKKERS, E. et al Development and evaluation of alternative testing methods for the in vivo NIH potency test used for the quality control of inactivated rabies vaccines. **Developments in Biological Standardization**, v.86, p.137-45, 1996.

RUPPRECHT, C.E.; KUZMIN, I.; MESLIN, F. Lyssaviruses and rabies: current conundrums, concerns, contradictions and controversies. **F1000 Research**, v.6, n.184, p. 1-22, fev. 2017. Disponível em: <http://doi:10.12688/f1000research.10416.1>>. Acesso em: 24 out. 2018.

RUSSELL, W.M.S.; BURCH, R.L. (1959). **The Principles of human experimental technique**. London: Methuen and Co. Ltd.

SANOFI. **Os desafios da produção**. Disponível em: <http://www.sanofipasteur.com.br/nosso-compromisso/os-desafios-da-producao>>. Acesso em: 01 set. 2017.

_____. **Vacina raiva**. Disponível em:

<http://www.sanofipasteur.com.br/ckfinder/userfiles/files/Bula-Verorab.pdf>. Acesso em: 08 maio 2018.

SELIGMANN JR, E.B. Potency-test requirements of the United States National Institute of Health (NIH). In: LABORATORY Techniques in Rabies. 2. ed. WHO, Geneva, 1966. p. 145.

SERVAT, A.; CLIQUET, F. Mouse Potency Testing of Rabies Vaccines. In: RUPPRECHT, C; NAGARAJAN, T. **Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention**, London: Academic Press, 2015. p. 269-277.

SERVAT, A. et al A Step Forward in the Quality Control Testing of Inactivated Rabies Vaccines - Extensive Evaluation of European Vaccines by Using Alternative Methods to the In Vivo Potency Tests. **Alternatives to laboratory animals**, v.43, p. 19-27, 2015.

SCHIFFELERS, M-J. et al Replacing the NIH test for rabies vaccine potency testing: A synopsis of drivers and barriers. **Biologicals**, v.42, p.205-217, 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2014.04.001>.

SCHROCK, R.D. Cell-Based Potency Assays: expectations and realities. **BioProcessing Journal**, v.11, n. 3, p. 4-12, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.12665/J113.Schrock>.

SIGOILLOT-CLAUDE, C. et al A versatile in vitro ELISA test for quantification and quality testing of infectious, inactivated and formulated rabies virus used in veterinary monovalent or combination vaccine. **Vaccine**, v.33, n. 32, p. 3843-3849, 2015. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.06.091.

SILVA, N.N.; MARKUS, H.L.; PADILHA, A.A. Vacina anti-rábica tipo “Fuenzalida” modificada. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, p. 223-226, 1967.

SMITH, T.G. et al An electrochemiluminescence assay for analysis of rabies virus glycoprotein content in rabies vaccines. **Vaccine**, v.31, p. 3333-3338, 2013.

SCHUMACHER, C.L. et al Use of mouse anti-rabies monoclonal antibodies in postexposure treatment of rabies. **The Journal of clinical investigation**, v.84, p. 971–975, 1989.

SOKOL, F. et al Biochemical and biophysical studies on the nucleocapsid and on the RNA of rabies virus. **Virology**, v.38, p. 651-655, 1969.

SOKOL, F.; STANCEK, D.; KOPROWSKI, H. Structural proteins of rabies virus. **Journal of Virology**, v.7, p. 241, 1971.

STATISTICAL analysis of results of biological assays and tests. In: THE EUROPEAN Pharmacopoeia. 9. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2016. p. 9.2-4353. Cap. 5.3.

STEELE, J.H.; FERNANDEZ, P.J. History of rabies and global aspects. In: BAER GM, ed. **The Natural History of Rabies**. 2. ed. Boston: CRC Press; 1991. cap. 1. p.1-26.

STOKES, W.S. Reducing unrelieved pain and distress in laboratory animals using humane endpoints. **ILAR Journal**, v.41, n. 2, p. 59-61, 2000.

STOKES, W.S. Humane endpoints for laboratory animals used in regulatory testing. **ILAR Journal**, v.43(Suppl), S31-S38, 2002.

STOKES, W.; KULPA-EDDY, J.; MCFARLAND, R. Introduction and summary of the international workshop on alternative methods to reduce, refine, and replace the use of animals in vaccine potency and safety testing: state of the science and future directions. **Procedia in Vaccinology**, v.5, p.1-15, 2011.

STOKES, W.; MCFARLAND R.; KULPA-EDDY, J.; GATEWOOD, D.; LEVIS, R.; HALDER, M. *et al* Report on the international workshop on alternative methods for human and veterinary rabies vaccine testing: State of the science and planning the way forward. **Biologicals**, v.40, p.369-381, 2012.

SWANN J.P. The 1941 sulfathiazole disaster and the birth of good manufacturing practices. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.53, n. 3, p. 148-153, 1999.

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: MESLIN, F-X; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKY, H. (Ed.). **Laboratory Techniques in Rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 28-51. Cap. 3.

UNITED STATES of America, 1963 28 **FR 6385-6387**, june 20, 1963.

The Viruses, Serums, Toxins, Antitoxins, and Analogous Products. In: UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Virus-Serum-Toxin Act 21 USC 151-159 et. Seq.** Washington, 1913. Chap. 5. Disponível em: <http://www.law.umaryland.edu/marshall/crsreports/crsdocuments/RS2201401032005.pdf>. Acesso em 01 set. 2017.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Animal and Plant Health Inspection. Service Veterinary Services. **Guidelines for validation of in vitro potency assays.** Disponível em: https://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications/memo_800_112.pdf. Acesso em: 15 maio 2017.

VERNON, S.K.; NEURATH, A.R.; RUBIN, B.A. Electron microscopic studies on the structure of rabies virus. **Journal of Ultrastructure Research**, v.41, p. 29, 1972.

VODOPIJA, I.; CLARCK, H.F. Human vaccination against rabies. In: Baer, G. M. **The Natural History of Rabies**. 2. ed. CRC press, 1991. Cap. 31, p. 571-595.

WEIBER, K.; HECHLER, U. **Animal welfare aspects in the quality control of immunobiologicals.** Nottingham: Frame, 1997.

WEISS, R.A.; BENNETT, P.L.P. Assembly of membrane glycoproteins studied by phenotypic mixing between mutants of vesicular stomatitis virus and retroviruses. **Virology**, v. 100, n. 2, p. 252-274, 1980.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Rabies.** Disponível em: <http://www.who.int/rabies/en/>. Acesso em: 06 ago. 2014.

_____. **Rabies – epidemiology.** Disponível em: <http://www.who.int/rabies/epidemiology/en/>. Acesso em: 24 out. 2018.

_____. **WHO expert committee on rabies: eighth report.** Geneva: WHO, 1992. (Technical report series, 824).

_____. **WHO expert consultation on rabies: first report.** Geneva, Switzerland: 2005. (Report No.: TRS 931).

_____. **Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards.** Geneva, 2006. (WHO Technical Report Series, n. 932).

_____. **Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs**. Geneva, 2007. p. 109-110. (WHO Technical Report Series, n. 941).

_____. GLOBAL VACCINE SAFETY INITIATIVE (GVSI). 4, 2015. France. **[Proceeding...]**. Fance, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/vaccine_safety/news/GVSI_report_Oct2015.pdf?ua=1>. Acesso em: 01 set. 17.

WHITE, D.O.; FENNER, F.J. **Medical virology**. 4 ed. San Diego: Academic Press, 1994.

WILBUR, L.A.; AUBERT, M.F.A. The NIH test for potency. In: MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI H. **Laboratory Techniques in Rabies**. 4. ed. Geneva: WHO, 1996. p. 360-368.

WINSNES, R.; SESARDIC, D.; DAAS, A.; BEHR-GROSS, M-E. Collaborative study for the validation of serological methods for potency testing of diphtheria toxoid vaccines part 1. **Pharmeuropa Bio**, v.2, p. 35-68, 2003.

WOODCOCK, J. Reliable drug quality: na unresolved problem. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.66, p. 270-272, 2012.

WUNNER, W.H. The chemical composition and molecular structure of rabies viruses. In: BAER, G.M. (Ed.). **The natural history of rabies**. 2 ed. Boston: CRC Press; 1991. p. 31-67. Cap. 2.

WUNDERLI, P.S. et al The protective role of humoral neutralizing antibody in the NIH potency test for rabies vaccines. **Vaccine**, v.9, p. 638-642, 1991.

WUNDERLI, P.S. et al Effect of heterogeneity of rabies virus strain and challenge route on efficacy of inactivated rabies vaccines in mice. **American Journal of Veterinary Research**, v.64, p.499-505, 2003.



WUNDERLI, P.S. et al The rabies peripheral challenge test: more accurate determination of vaccine potency. **Vaccine**, v.24, p. 7115-7123, 2006.

YANG, H. **Emerging non-clinical biostatistics in biopharmaceutical development and manufacturing**. Boca Raton: CRC Press, 2016. p. 386.

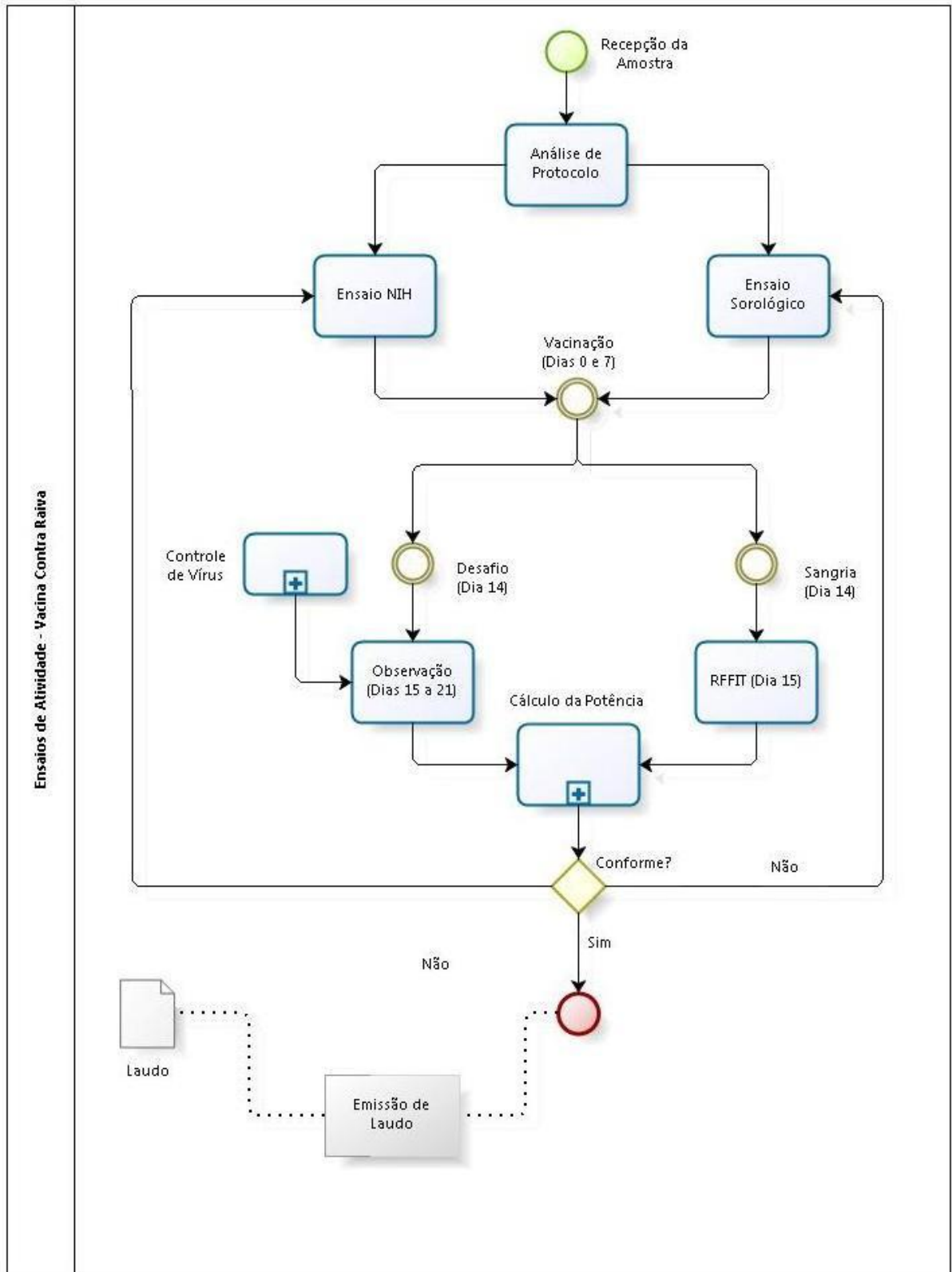
ZALAN, E.; WILSON, C.; PUKITIS, D. A microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. **Journal of Biological Standardization**, v.7, p. 213-220, 1979.

ZINKE G. Neue Ansichten der Hundswuth, ihrer Ursachen und Folgen nebst einer sichern Behandlungsart der von tollen Thieren gebissenen Menscher. **Gabler Jena Review**, v.16, p. 212, 1804.

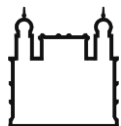
ANEXO 1 – LICENÇA LW-17/16 EXPEDIDA PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FIOCRUZ.

 <p>Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Vice- Presidência de Pesquisa e Coleções Biológicas</p>	 <p>CEUA FIOCRUZ Comissão de Ética no Uso de Animais</p>
LICENÇA	
LW-17/16	
<p>Certificamos que o protocolo (P-16/15-4), intitulado "Desenvolvimento de Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas contra Raiva de Uso Humano", sob a responsabilidade de WILDEBERG CAL MOREIRA, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.</p>	
<p>Esta licença tem validade até 30/05/2020 e inclui o uso total de :</p>	
<p>Mus musculus - 1480 Machos de Swiss Webster, Idade: 3 Semana(s), Peso: 14,0000 Grama(s). - 1480 Fêmeas de Swiss Webster, Idade: 3 Semana(s), Peso: 14,0000 Grama(s).</p>	
<p>Rio de Janeiro, 30 de maio de 2016</p>	
<p>Octavio Augusto França Presgrave Coordenador da CEUA</p>	
<p>Comissão de Ética no Uso de Animais Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Mangueiras - Rio de Janeiro / RJ Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br</p>	

APÊNDICE A – FLUXOGRAMA DOS ENSAIOS DE POTÊNCIA



APÊNDICE B – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO - ENSAIO SOROLÓGICO PARA AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE VACINAS CONTRA RAIVA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

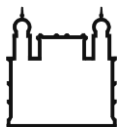
TÍTULO: Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas contra Raiva	NÚMERO 65.3430-XXX
---	------------------------------

PALAVRAS-CHAVE SORO - RAIVA- VACINA - RFFITm	REVISÃO 00	SEÇÃO DO MANUAL 4.3
--	----------------------	-------------------------------

ELABORADO Wildeberg Cál Moreira	VERIFICADO Wlamir Corrêa de Moura	APROVADO	REFERENDADO	DATA 00/00/2018
---	---	-----------------	--------------------	---------------------------

SUMÁRIO

1. Objetivo
2. Campo de aplicação
3. Definições
4. Siglas
5. Condições gerais
6. Condições específicas
7. Garantia da Qualidade
8. Bibliografia
9. Avaliação da bibliografia
10. Alterações com relação à revisão anterior
11. Anexos:
 - A. Protocolo padronizado
 - B. Tabela de doses anestésicas para camundongos



Ministério da Saúde

FIOCRUZ**Fundação Oswaldo Cruz****Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**

TÍTULO:	Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas contra Raiva	NÚMERO 65.3430-XXX
----------------	---	-------------------------------------

1. OBJETIVO

Este POP define e padroniza procedimentos para a avaliação da imunogenicidade da vacina contra raiva de uso humano pelo método sorológico. O Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas contra Raiva, alternativa ao método NIH, baseia-se na eliminação da etapa de desafio do EPNIH, sendo substituída pela determinação do título de anticorpos neutralizantes contra raiva em soros de animais vacinados, titulados em placas de 96 poços, pelo "Fluorescent Focus Inhibition Test" (RFFIT), que consiste na capacidade de os anticorpos contra raiva neutralizarem o vírus para cultura de células sensíveis e a presença viral residual é demonstrada pela técnica de anticorpos fluorescentes.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Os procedimentos descritos neste POP são aplicados no controle da qualidade de amostras de lotes de vacina contra a raiva que consistam de preparações contendo vírus rábico fixo inativado. Abrange o controle de vacinas desta natureza destinadas ao uso humano e às vacinas de referência.

O presente POP tem como POPs relacionados:

- a) Preparação de materiais para esterilização (65.3220.004);
- b) Processo de limpeza de materiais de laboratório (65.3220.006);
- c) Boas práticas em experimentação animal (65.3340.002);
- d) Registro de dados (65.1120.033);
- e) Manutenção de linhagens de células animais (65.3430.031);
- f) Ensaio de potência para vacina contra a raiva (65.3430.018);
- g) Gráficos de controle para medidas individuais e amplitudes móveis em ensaios biológicos (65.3400.002);
- h) Ensaio de potência "in vitro" para soro antirrábico (65.3430.029).

3. DEFINIÇÕES

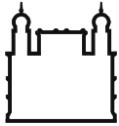
Para efeito deste POP, são adotadas as seguintes definições:

3.1 - Vacina Contra a Raiva

Preparação contendo vírus rábico fixo inativado, podendo ainda conter conservantes.

3.2 - Produto

Vacina contra a raiva a ser controlada.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



TÍTULO: Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas contra Raiva	NÚMERO 65.3430-XXX
---	-------------------------------------

3.3 - Lote

Quantidade conhecida de produto preparado em uma única etapa de trabalho conforme comprovação protocolar do fabricante.

3.4 – Desafio

Inoculação de vírus rábico infeccioso por via intracerebral em camundongos.

3.5 - Vacina de Referência Contra a Raiva

Vacina contra a raiva produzida, controlada e distribuída por órgão de referência. Esta preparação serve para avaliar vacinas pelo método de NIH, sendo sua potência expressa em UI/mL.

3.6 - DE50

Dose de produto expressa em diluição (ou sua recíproca) que protege 50% dos animais inoculados por via IC com vírus-trabalho.

3.7 – Imunoglobulina heteróloga – soro antirrábico (SAR).

Suspensão contendo anticorpos purificados (F-ab' 2) contra o vírus rábico, obtidos de soro de equídeos hiperimunizados, podendo ainda conter conservantes.

3.8 – Imunoglobulina homóloga – Imunoglobulina antirrábica humana (IgAR).

Preparação purificada e concentrada contendo anticorpos de origem humana contra raiva, podendo ainda conter conservantes.

3.9 – Vírus trabalho (VT)

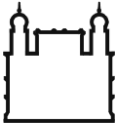
Quantidade de vírus rábico fixo da cepa CVS-11, produzida em cultura de células, com composição uniforme e conservada em condições adequadas.

3.10 – Dose Formadora de Focos Fluorescentes 50% - DFF50

Diluição de vírus rábico capaz de infectar células em cultura e produzir pelo menos um foco fluorescente em 50% dos campos microscópicos observados.

3.11 - Imunoglobulina de referência

Imunoglobulina antirrábica homóloga ou heteróloga produzida, controlada e distribuída por órgão



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



TÍTULO:

**Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas
contra Raiva**

**NÚMERO
65.3430-XXX**

de referência. Esta preparação destina-se a avaliar soros em ensaios de neutralização do vírus rábico in vitro e in vivo, sendo sua potência expressa em UI/mL.

3.12 - Dose Inibidora de Focos Fluorescentes 50% - DIFF50

Diluição de produto que inibe, por ação neutralizante dos anticorpos presentes, a infecção de células em cultura, e conseqüentemente, a formação de focos fluorescentes de vírus rábico em 50% dos campos microscópicos.

3.13 – Amostras para sorologia

As amostras para sorologia avaliadas por ENVRC são tipicamente soro, mas podem incluir fluido cefalorraquidiano humano ou animal e plasma (pode ser usado apenas o plasma obtido com citrato, ou plasma obtido com heparina, mas não o plasma obtido com EDTA).

As amostras devem ser avaliadas para presença de hemólise e lipemia, e se necessário, novas amostras mais adequadas devem ser obtidas antes do teste. Os soros devem ser inativados pelo calor a 56 °C durante 30 minutos. Estas amostras devem ser testadas nas diluições finais (após adição de vírus) de 1: 4, 1:8, 1: 16, e 1: 32 (1:2 para diluição de triagem) (Yager; Moore, 2015).

3.14 – Potência do soro

Valor da relação entre a DIFF50 do soro teste e a DIFF50 do soro de referência, multiplicado pelo fator de diluição inicial do soro teste e expresso em UI/mL.

3.15 - Potência

Valor da relação entre a DE50 da vacina teste e a DE50 da vacina de referência, multiplicado pela relação entre o volume das doses das mesmas e expresso em UI/dose.

3.16 – Protocolo

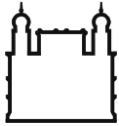
Documento padronizado que reúne todos os dados referentes à realização de um procedimento técnico e cujo registro se faz necessário.

3.17 – CombiStats

Programa de computador do EDQM para análise estatística de dados originados de ensaios biológicos de diluição, que inclui, além da aqui citada análise de probitos: análise de linhas paralelas, análise de slope ratio, determinação de DE50, ajuste logístico de curva de 4 parâmetros, teste de limite para ensaios de dose única e combinação de resultados de ensaios.

4. SIGLAS

CVS - Vírus padrão de desafio (do inglês “Challenge Virus Standard”)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



TÍTULO: Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas contra Raiva	NÚMERO 65.3430-XXX
---	-------------------------------------

CCID50 – Dose Infecciosa para Cultura de Células 50% (do inglês “Cell Culture Infectious Dose”)

DE50 – Dose efetiva 50%

DFF50 – Dose formadora de focos fluorescentes 50%

DIFF50 - Dose inibidora de focos fluorescentes 50%

Ph. Eur. – Farmacopeia Europeia

Ig – Imunoglobulina

IgAR – Imunoglobulina Antirrábica

MEM – Meio essencial mínimo – suplementado com 5% de SFB para manutenção de cultivo celular

MV – Meio para vírus - suplementado com 2,5% de SFB para realização dos ensaios

MOI – Multiplicidade de infecção (do inglês “Multiplicity Of Infection”)

OMS - Organização Mundial de Saúde (Suíça)

PBS – Salina tamponada com fosfatos (do inglês “Phosphate Buffered Saline”)

ENVRC – Ensaio de neutralização do vírus rábico em células

SAR - Soro Antirrábico

SFB – Soro Fetal Bovino

SR – Soro de referência

ST – Soro teste

TAF – Técnica de Anticorpos Fluorescentes

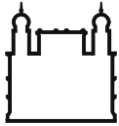
UI - Unidades Internacionais

VT - Vírus-trabalho

EDQM – European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (França)

ATCC – American Type Cell Collection (EUA)

NIBSC – National Institute of Biological Standards and Control (Inglaterra)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



TÍTULO:

**Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas
contra Raiva**

**NÚMERO
65.3430-XXX**

BHK – Baby Hamster Kidney

ES - Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas contra Raiva

NIH – National Institute of Health

EPNIH – Ensaio de Potência de NIH

EMA - European Medicines Agency (atualmente EMA)

OECD - Organização Intergovernamental de Cooperação e Desenvolvimento Econômico

USP – United States Pharmacopoeia

ISO – International Organization for Standardization

ICH – International Council for Harmonization (antes de out/2015 International Conference for Harmonization)

CVS – Challenge Virus Standard

RFFIT - Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test

WHO – World Health Organization

ip – intraperitoneal

ic – intracerebral

MV – Meio para vírus

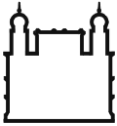
TAF - Técnica de Anticorpos Fluorescentes

5. CONDIÇÕES GERAIS

Para execução deste ensaio deve-se dispor de:

5.1 - Amostra a ser analisada:

Quantidade do mesmo lote de produto que é mantida nas condições de conservação indicadas pelo fabricante (em geral de 2 a 8 °C). Não são feitos “pools”, o ensaio é realizado utilizando 0,5 mL do produto, para preparações das diluições, por imunização, então são necessários dois frascos (mínimo de 1 mL) de amostra para cada ensaio. Porém, devem estar disponíveis 3,0 mL do produto (6 frascos), suficientes para realização de um ensaio e duas repetições, caso haja ne-



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



TÍTULO:

**Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas
contra Raiva**

**NÚMERO
65.3430-XXX**

cessidade.

5.2 - Padrões e substâncias biológicas de referência:

5.2.1 – Vacina de Referência Contra a Raiva:

Vacina de referência com potência padronizada em UI/mL, deve ter sido estabelecida conforme descrito no POP 65.3430.017.

5.2.2 -- Vírus trabalho

A Cepa utilizada é o CVS 11, adaptado a cultura de células. O vírus trabalho deve ser produzido e controlado como descrito no POP 65.3430-029.

5.2.3 – Imunoglobulina de Referência

Volume mínimo de 150 μ L (para 3 replicatas) do produto por prova.

5.2.3.1 - IgAR ou SAR de referência nacional estabelecidos frente a uma referência de título padronizado, segundo o POP INCQS 65.3430.025, caso o ensaio seja aplicado ao produto para uso profilático.

5.2.3.2 - IgAR de referência internacional fornecida por órgão internacional de referência ou SAR de referência nacional estabelecido frente a uma IgAR de referência internacional, caso o ensaio seja aplicado para aferição de produto para uso como referência.

5.3 - Animais:

Camundongos Suíços-albinos de 11 a 14 g, que devem ser mantidos de acordo com o POP 65.3340.002. Uma amostragem mínima de 25% dos animais deve ser pesada, sendo os dados registrados nos protocolos padronizados constantes nos Anexos A.

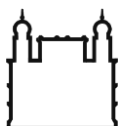
5.4 – Linhagem celular

A presente técnica utiliza a linhagem celular BHK-21, com no máximo 30 passagens (contadas a partir da semente da ATCC), em cultura semiconfluente com 2 a 4 dias de crescimento. As culturas celulares devem ser manipuladas e mantidas segundo o POP INCQS 65.3430.031.

5.2 - Amostra para sorologia:

Volume mínimo de 150 μ L (para 3 replicatas) do produto por prova.

5.4 - Vidraria:



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



TÍTULO: Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas contra Raiva	NÚMERO 65.3430-XXX
---	-------------------------------------

Toda vidraria utilizada deve ser lavada segundo o POP INCQS 65.3220.006 e preparada e esterilizada conforme o POP INCQS 65.3220.004.

5.5 - Biossegurança:

Os procedimentos devem ser realizados adotando-se medidas de biossegurança descritas por Kaplan (1996).

5.6 - Registro de dados

Todos os procedimentos devem ser registrados no protocolo padronizado, conforme modelos constantes nos Anexos A (Ensaio de Potência), B (produção de vírus trabalho) e C (Determinação de título de vírus), devendo ser assinados pelos executores e afixados no Livro de ensaio de potência para vacina, Livro de registro de produção de vírus rábico em cultura de células (anexo B) ou em pastas devidamente identificadas e arquivados sob a responsabilidade de um técnico lotado no laboratório.

Os resultados de ensaios obtidos no software de cálculos estatísticos CombiStats devem ser impressos e colados nos cadernos de ensaio, rubricados e datados como descrito no POP 65.1120.033.

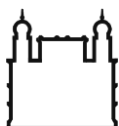
6. CONDIÇÕES ESPECÍFICAS

6.1 – Equipamentos, Instrumentos e Materiais Utilizados

Conforme listados nos Procedimentos Operacionais Padronizados – POP/INCQS - nº 65.3430.018 – Ensaio de potência para vacina contra raiva e nº 65.3430.029 – Ensaio de potência "in vitro" para soro antirrábico.

6.1.1 - Material

- a) amostra a ser analisada, volume mínimo de 150 μ L do soro na diluição de prova (Item 5.1 e 5.2);
- b) vírus trabalho (cepa CVS-11), diluído para conter 200 DFF50/50 μ L iniciais (Item 5.2.2);
- c) 150 μ L de Imunoglobulina de referência na diluição de prova (Item 5.2.3);
- d) garrafas para cultivo celular, estéreis, com capacidade para 25, 75 e 175 cm²;
- e) solução de tripsina;
- f) câmara de Neubauer;
- g) cultura de linhagem de células BHK-21 (C13), (nº ATCC - CCL-10);
- h) bandeja com gelo;
- i) micropipeta monocal 50-200 μ L;
- j) micropipeta monocal 100-1000 μ L;
- k) micropipeta multicanal 50-300 μ L;
- l) micropipeta multicanal 10-100 μ L;
- m) ponteiras estéreis para micropipetas;
- n) microplaca de 96 orifícios estéril, para cultivo celular (Falcon 35-3072);



Ministério da Saúde

FIOCRUZ**Fundação Oswaldo Cruz****Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**

TÍTULO: Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas contra Raiva	NÚMERO 65.3430-XXX
---	-------------------------------------

- o) adesivo para selar microplacas;
- p) parafilm;
- q) pipetas estéreis com capacidades para 2, 5, 10 e 25 mL;
- r) meio de manutenção de culturas (MEM) - Meio Essencial Mínimo de Dulbecco com 5% SFB;
- s) meio para Vírus (MV) - Meio Essencial Mínimo de Dulbecco com 2,5% SFB;
- t) agitador de tubos;
- u) pipetador automático;
- v) estufa a $37 \pm 0,5$ °C, com atmosfera de 5% de CO₂, umidificada;
- w) estufa a $35 \pm 0,5$ °C,
- x) gabinete de biossegurança;
- y) microscópio invertido, com UV, dotado de sistema de filtros para Isotiocianato de fluoresceína (FITC) e sistema de ocular e objetiva que garanta aumento de 200X;
- z) conjugado antinucleocapsídeo do vírus rábico;
- aa) câmara úmida (caixa plástica ou metálica com tampa, contendo base de tecido sintético umedecido);
- bb) salina tamponada com fosfatos (Anexo D);
- cc) freezer -70 °C;
- dd) solução DEAE-Dextran a 20% (Anexo E);
- ee) tubos estéreis (para centrífuga Beckman refrigerada) com tampa de rosca, capacidade 30 mL;
- ff) tubos estéreis em polipropileno, para centrífuga, com tampa de rosca, capacidade 15 mL e 50 mL.

6.2 - Amostra a ser analisada:

Quantidade do mesmo lote de produto que é mantida nas condições de conservação indicadas pelo fabricante (em geral de 2 a 8° C). Não são feitos "pools", o ensaio é realizado utilizando 0,5 mL do produto, para o preparo das diluições por imunização, sendo necessários dois frascos (mínimo de 1 mL) de amostra para cada ensaio. Porém, devem estar disponíveis 3,0 mL do produto (6 frascos), suficientes para realização de um ensaio e duas repetições, caso haja necessidade.

No RFFIT - Volume mínimo de 250 μ L (para 5 replicatas) do produto por prova.

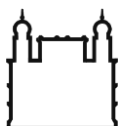
6.3 - Padrões e substâncias biológicas de referência:

6.3.1 - Vacina de Referência Contra a Raiva:

Vacina de referência com potência padronizada em UI/mL, deve ter sido estabelecida conforme descrito no POP/INCQS 65.3430.017.

6.3.2 – Vírus trabalho

A Cepa utilizada é o CVS 11, adaptado a cultura de células. O vírus trabalho deve ser produzido e controlado como descrito no POP/INCQS 65.3430.029.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



TÍTULO: Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas contra Raiva	NÚMERO 65.3430-XXX
---	-------------------------------------

6.3.3 – Imunoglobulina de Referência

Volume mínimo de 250 μ L (para 5 replicatas) do produto por prova.

6.3.3.1 - IgAR ou SAR de referência nacional estabelecidos frente a uma referência de título padronizado, segundo o POP/INCQS 65.3430.025.

6.4 - Animais:

Camundongos Suíços-albinos de 11 a 14 g, mantidos de acordo com o POP/INCQS 65.3340.002.

6.5 – Linhagem celular

A presente técnica utiliza a linhagem celular BHK-21, com no máximo 30 passagens (contadas a partir da semente da ATCC), em cultura semi-confluente com 2 a 4 dias de crescimento. As culturas celulares devem ser manipuladas e mantidas segundo o POP/INCQS 65.3430.031.

6.6 - Procedimentos:

A vacina de Referência e as amostras serão previamente diluídas em solução salina tamponada com fosfatos pH 7,6 para obter as três diluições desejadas. Os animais serão vacinados com 2 (ou uma) doses nos dias 0 e 7, e sangrados por punção cardíaca no dia 14. Os soros serão titulados individualmente e os títulos de anticorpos expressos em UI/mL serão utilizados para estimar a potência da vacina, calculados pelo método de Probitos no software estatístico CombiStats (EDQM, 2013).

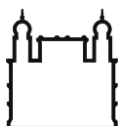
6.6.1 - Imunização dos animais:

Devem ser realizadas duas imunizações com intervalo de 7 dias como segue:

- a) Reconstituir a vacina de referência e a vacina teste conforme indicação da bula;
- b) Preparar 06 frascos de 30 mL identificando-os de acordo com a diluição das vacinas teste e referência, como no exemplo a seguir:

Vacina teste 1/25	Vacina Referência 1/50
Vacina teste 1/125	Vacina Referência 1/250
Vacina teste 1/625	Vacina Referência 1/1250

- c) Preparar três diluições fator $q=5$ de cada vacina (Tabela 1), utilizando solução salina tamponada com fosfatos pH 7,6, mantida refrigerada entre 2 a 8° C.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ**Fundação Oswaldo Cruz****Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**

TÍTULO:	Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas contra Raiva	NÚMERO 65.3430-XXX
----------------	---	-------------------------------------

Tabela 1- Diluição das vacinas

	Referência			Teste		
	Dil	Vacina	Diluyente	Dil	Vacina	Diluyente
Pré-Diluição	1/25	0,5 mL	12 mL	-	-	-
Diluição 1	1/50	6 mL	6 mL	1/25	0,5 mL	12 ml
Diluição 2	1/250	3 mL	12 mL	1/125	3 mL	12 mL
Diluição 3	1/1250	3 mL	12 mL	1/625	3 mL	12 mL

- d) Fechar os frascos com tampa de borracha estéril, vedá-los com parafilm e mantê-los em banho de gelo;
- e) Executar as diluições em gabinete de biossegurança, utilizando pipetas ou pipetadores com ponteiros estéreis;
- f) Inocular 0,5 mL de cada diluição por via ip, utilizando seringas de 3 ml e agulhas 13 x 4,5 mm, em no mínimo 5 camundongos;
- g) Manter os animais inoculados em gaiolas para camundongos identificadas com etiqueta própria.

6.6.2 - Manutenção dos animais:

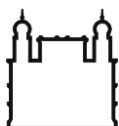
Os animais devem ser mantidos em gaiolas apropriadas por 14 dias.

6.6.3 – Sangria:

No dia 14 após a imunização, amostras de sangue são retiradas sob anestesia com uma associação de Ketamina (150mg/Kg) e Xilazina (10mg/Kg) ip, após contenção mecânica, utilizando seringa de 1,0 mL e agulha 13 x 4,5 mm (MASSONE, 2011). A sangria é realizada por punção cardíaca, deixar retraindo o coágulo “over night” sob 4 a 8° C, centrifugar 200xG por 15 ±1 minuto. Inativar os soros a 56o ±1o C por 30 ±1 minuto e manter em congelador -20o C até serem testados individualmente para a determinação dos títulos de anticorpos neutralizantes pelo ensaio de Neutralização do Vírus Rábico em células (ENVRC) (Moura et al., 2008; BRASIL, 2010).

6.7 – Titulação de soros

As amostras de soro são tituladas de acordo com o Ensaio de potência "in vitro" para soro antirrábico (POP 65.3430.029), que utiliza o ENVRC, como descrito na Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010) uma adaptação do RFFIT (Council of Europe, 2016; Yager, Moore, 2015? Livro Ruprech) a placas de 96 poços.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



TÍTULO: Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas contra Raiva	NÚMERO 65.3430-XXX
---	-------------------------------------

6.7.1 - Preparação da Referência Internacional:

- a) Em geral deve haver neutralização completa do vírus até uma concentração de 0,031 UI/mL de um soro de referência pré-diluído para conter 1 UI/mL, o que, quando diluído serialmente em fator 2, representa a diluição 1/32.
- b) para realizar os ensaios, descongelar a alíquota de 1 UI/mL diluída a 1/4, que ao ser adicionada aos 50 µL distribuídos nos primeiros poços da placa, passará a 1/8 e depois a 1/16 com a adição do VT.

6.7.2 - Vírus Neutralização

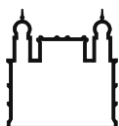
- a) Até 8 soros em duplicata poderão ser testados em cada placa.
- b) Pré diluir o SR (6.7.1).
- c) distribuir 50 µL de MV em cada um dos poços de uma placa de 96 poços (exceto E11 a H12 que ficarão vazios ou receberão soro normal pré diluído em E11 e 12 e controle de células G12 e H12);
- d) adicionar 50 µL da diluição 1/4 da Preparação de Referência diluída, como descrito acima, aos primeiros três orifícios da placa destinados à referência;
- e) distribuir 50 µL dos soros teste no 1º e 2º poço destinados a estes;
- f) adicionar 50 µL das diluições 1/4 das Igs ao primeiro poço em cada linha e misturar por aspiração com micropipeta, para realizar diluições fator 2 a partir de 1:8 até 1:64 (após adição do VT as diluições dobrarão e passarão a 1/16 a 1/128);
- g) transferir 50 µL da mistura resultante ao próximo poço. Repetir a operação por um total de quatro poços para o SR (triplicatas) e quatro poços para cada ST (duplicatas);
- h) desprezar 50 µL de cada um dos últimos poços de cada diluição;
- i) preparar três colunas para titulação do vírus (A10 a D12), distribuindo 50 µL de MV em cada poço (duplicatas);
- j) descongelar um tubo do VT e diluir em MV para a diluição de trabalho que contenha 200 DFF50 iniciais e preparar mais 3 tubos com diluições decimais de controle do título a partir da diluição de trabalho (Trabalho, 1/10; 1/100 e 1/1000);
- k) distribuir 50 µL da diluição de trabalho em cada poço contendo soro.

6.7.3 - Titulação do vírus trabalho e adição das células

- a) distribuir 50 µL de cada uma das diluições decimais do vírus aos poços de controle do título viral (Trabalho A10 a 12; 1/10 B10 a 12; 1/100 C10 a 12 e 1/1000 D10 a 12);
- b) as diluições do vírus desta forma sofrerão uma diluição 1/2 o que, para efeito de cálculo, representará um acréscimo de 0,3 log às diluições logarítmicas, e.g. diluições iniciais -3,5; -4,5; -5,5 e -6,5 passam a ser -3,8 a -6,8;
- c) incubar a placa a 37º C em estufa com atmosfera de 5% de CO2 por 90 minutos.

6.7.4 - Preparação das células

- a) enquanto a mistura de vírus-soro é incubada, preparar as células BHK-21 para uso 30 minutos antes do término dos 90 minutos de incubação;



Ministério da Saúde

FIOCRUZ**Fundação Oswaldo Cruz****Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**

TÍTULO:	Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas contra Raiva	NÚMERO 65.3430-XXX
----------------	---	-------------------------------------

- b) a partir de um frasco contendo células que tenham crescido com 80 a 95% de confluência, dissociar as células com tripsina;
- c) ressuspender as células em MV à temperatura ambiente e resfriar rapidamente em banho de gelo;
- d) agitações repetidas durante o resfriamento impedirão a formação de agregados celulares;
- e) contar as células em uma câmara de Neubauer e ajustar a concentração para $3,5 \times 10^5$ cel/mL adicionando MV frio;
- f) manter a 4 a 8 °C (células assim tratadas poderão ser usadas por mais de uma semana);
- g) adicionar 100 µL da suspensão de células a cada poço;
- h) cobrir a placa com adesivo e incubar à 37 °C em uma estufa umidificada contendo atmosfera de 5% CO₂ por 24 horas \pm 15 minutos.

Figura 1 – Diagrama de placa para ensaio de potência in vitro para imunoglobulinas A.R.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SR1 1:16	SR2 1:16	SR3 1:16	ST1 1:4	ST1 1:4	ST2 1:4	ST2 1:4	ST3 1:4	ST3 1:4	VT1 1:2	VT2 1:2	VT3 1:2
B	SR1 1:32	SR2 1:32	SR3 1:32	ST1 1:8	ST1 1:8	ST2 1:8	ST2 1:8	ST3 1:8	ST3 1:8	VT1 -1	VT2 -1	VT3 -1
C	SR1 1:64	SR2 1:64	SR3 1:64	ST1 1:16	ST1 1:16	ST2 1:16	ST2 1:16	ST3 1:16	ST3 1:16	VT1 -2	VT2 -2	VT3 -2
D	SR1 1:128	SR2 1:128	SR3 1:128	ST1 1:32	ST1 1:32	ST2 1:32	ST2 1:32	ST3 1:32	ST3 1:32	VT1 -3	VT2 -3	VT3 -3
E	ST4 1:4	ST4 1:4	ST5 1:4	ST5 1:4	ST6 1:4	ST6 1:4	ST7 1:4	ST7 1:4	ST8 1:4	ST8 1:4	SN 1:4	SN 1:4
F	ST4 1:8	ST4 1:8	ST5 1:8	ST5 1:8	ST6 1:8	ST6 1:8	ST7 1:8	ST7 1:8	ST8 1:8	ST8 1:8		
G	ST4 1:16	ST4 1:16	ST5 1:16	ST5 1:16	ST6 1:16	ST6 1:16	ST7 1:16	ST7 1:16	ST8 1:16	ST8 1:16		CC
H	ST4 1:32	ST4 1:32	ST5 1:32	ST5 1:32	ST6 1:32	ST6 1:32	ST7 1:32	ST7 1:32	ST8 1:32	ST8 1:32		CC

VTn – Vírus trabalho

SRn – Soro Padrão de Referência

STn – Soro Teste

SN – Soro Normal

CC – Controle de células

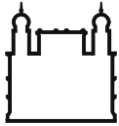
(n = número da replicata ou amostra)

6.7.5 - Técnica de Anticorpos Fluorescentes (TAF) e leitura:

Após 24 horas, realizar a TAF e ler a placa em microscópio invertido de imunofluorescência em aumento de 200x.

6.7.5.1 - Procedimento:

- a) Lavar a microplaca duas vezes com PBS, adicionando 50 µL de PBS a cada poço e vertendo o conteúdo da placa em solução viricida (e.g. hipoclorito de sódio);



Ministério da Saúde

FIOCRUZ**Fundação Oswaldo Cruz****Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde****TÍTULO:****Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas
contra Raiva****NÚMERO
65.3430-XXX**

- b) fixar em acetona gelada diluída a 80% com água, por 15 minutos;
 c) verter a acetona da placa em solução de hipoclorito de sódio e secar ao ar;
 d) verificar as placas quanto a possível citotoxicidade (falta de monocamada, segmentos isentos de células em monocamada, descolamento de monocamadas). As observações são escritas na folha de leitura em branco;
 d) adicionar 40 µL de conjugado (diluído segundo instruções do fabricante), a cada poço. Incubar a $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$ por 30 ± 1 minuto;
 e) lavar com PBS duas vezes;
 f) examinar em microscópio para imunofluorescência em aumento de 200x;
 g) contar oito campos de cada poço (ZALAN et al., 1979) como demonstrado na Figura 2;
 h) anotar os resultados em protocolo apropriado expressando o número de campos positivos por campos lidos (e.g. 8/8, 4/8, 2/8, 0/8 etc.);
 g) ao final da prova será possível calcular as doses efetivas pelo método dos probitos.

OBS:

- 1) A lâmpada U.V. do microscópio de imunofluorescência deve ser ligada 10 minutos antes da leitura das placas e, uma vez desligada, deve-se aguardar uma hora antes de religá-la. Os registros de uso do microscópio devem ser realizados no formulário constante do Anexo C do PU-3400.004.
- 2) Ler sempre o número de campos positivos sobre o total de campos, mesmo na titulação dos soros.

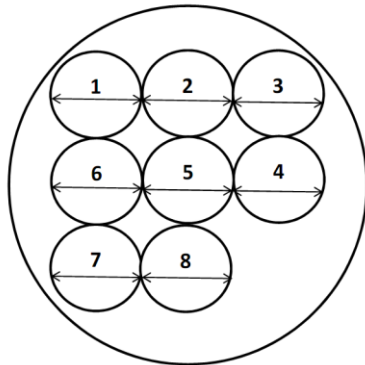
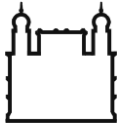


Figura 2 – Esquema exemplificando a leitura de cada poço de uma placa de 96 poços, 1 a 8 – campos microscópicos de leitura não coincidentes.

6.8 - Cálculos

6.8.1 - DIFF50 dos soros

Os valores obtidos para DIFF50 dos soros devem ser calculados pela aplicação do teste estatístico de análise de Probitos (AUBERT, 1996), usando computador, utilizando-se o programa de análise estatística para ensaios biológicos do EDQM, CombiStats. A utilização do programa está descrita no PU 65.3400.012.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



TÍTULO:

**Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas
contra Raiva**

**NÚMERO
65.3430-XXX**

6.8.2 - Potência (UI/mL)

A potência do soro teste é calculada pelo programa citado acima, que expressa os resultados já em UI/mL, pela aplicação da seguinte equação:

Potência = Recíproco DIFF50 T/ Recíproco DIFF50 R x UI de R

Onde:

DIFF50 T = Dose Inibidora De Focos Fluorescentes 50% do soro teste;

DE50 R = Dose Inibidora De Focos Fluorescentes 50% do soro de referência;

UI de R = Unidades internacionais do soro de referência.

6.8.3 - DFF50

O valor referente ao título do VT empregado no teste, ou seja, a DFF50, deve ser calculado pela aplicação do teste estatístico de análise de Probitos (AUBERT, 1996), utilizando-se o programa de análise estatística de ensaios biológicos do EDQM, CombiStats.

6.8.4 - DE50 da vacina

Os valores obtidos para DE50 das vacinas teste e de referência devem ser calculados pela aplicação do teste estatístico de análise de Probitos (Aubert, 1996), utilizando-se o programa de análise estatística de ensaios biológicos do EDQM, CombiStats como descrito no PU específico.

6.8.5 - Potência (UI/dose):

A potência da vacina teste, expressa em UI/dose, é fornecida pelo software como potência atribuída (Ass. Pot.) com o valor da dose (ex. dose= 0,5 mL, expressar Ass. Pot. Como ?UI/0,5 mL no CombiStats).

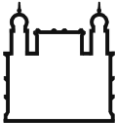
7 – GARANTIA DA QUALIDADE

7.1 – Avaliação da validade do ES:

7.1.1 – Titulação dos soros

7.1.1.1 – A análise estatística mostre que há uma inclinação significativa na curva dose resposta ($p < 0,05$ - evidenciado no CombiStats pela presença de pelo menos um asterisco) e que não há desvios significativos de linearidade e de paralelismo ($p > 0,05$ - evidenciado no CombiStats pela ausência de asteriscos).

Caso haja desvios significativos de paralelismo, deve ser utilizado o teste estatístico de equivalência no CombiStats, que testa se a inclinação (slope) obtida pelas amostras é equivalente à obtida pelo padrão e deve ser avaliado comparando-se os intervalos de confiança obtidos para a diferença e a razão entre as inclinações do padrão e das amostras. Para que as



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



TÍTULO:

**Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas
contra Raiva**

**NÚMERO
65.3430-XXX**

inclinações sejam consideradas equivalentes, o intervalo de confiança obtido para a diferença deve compreender o valor 0 (zero) e o intervalo de confiança para a razão entre as inclinações deve compreender o valor 1 (um). Se o ensaio atende estes pré-requisitos as inclinações podem ser consideradas equivalentes e por consequência o paralelismo é considerado satisfatório (vide Figura 3).

Figura 3 – Teste de equivalência de inclinações no CombiStats.

7.1.1.2 - Controles não infectados (controle de células) apresentem pelo menos uma monocamada semiconfluente em cada poço.

7.1.1.3 - O título do vírus trabalho esteja entre 30 e 300 DFF50, o que é demonstrado pela presença de fluorescência na coluna de VT até 10-2.

7.1.1.4 - As DIFF50 das Ig de referência e teste estejam situadas entre a menor e a maior dose usadas no ensaio.

7.1.1.5 - A DIFF50 obtida para a Ig de referência permaneça dentro dos limites de confiança de 99%.

Este critério será avaliado lançando-se os resultados do logaritmo da DIFF50, a cada ensaio realizado, em gráficos de controle de valores individuais (x-chart) e de amplitudes móveis. O intervalo de confiança deverá ser calculado utilizando-se os primeiros 20 resultados, para tanto utilizar o software SPC EXPLORER RT, instalado no Departamento de Imunologia – LVV como recomendado no POP INCQS 65.3400.002. Os gráficos devem ser configurados para realizar os testes de desempenho (run tests) descritos na tabela do Anexo F do POP INCQS 65.3430.018 e no POP INCQS 65.3400.002.

Este procedimento é um controle interno da qualidade (CIQ), os ensaios onde o resultado exceda o primeiro teste de desempenho, ou seja, um ponto além de 3 desvios padrão serão considerados inválidos e o ensaio deverá ser repetido.

7.1.2 – Interpretação:

A conclusão do ensaio deve ser considerada satisfatória quando:

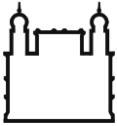
7.1.2.1 – O ensaio de titulação dos soros for válido;

7.1.2.2 – Quando o título do soro apresentar $\geq 0,5$ UI/mL.

7.1.2.3 – Critérios para retestes

7.1.2.3.1 – Ensaios invalidados:

Todo ensaio deverá ser repetido quando os resultados do primeiro ensaio forem inválidos. Se uma amostra de soro for considerada insatisfatória o ensaio poderá ser repetido (até no máximo três vezes). Desta forma, quando mais de um ensaio forem realizados, utilizando o software CombiStats, todos os resultados devem ser combinados para obter a média geométrica pondera-



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



TÍTULO: Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas contra Raiva	NÚMERO 65.3430-XXX
---	-------------------------------------

da, se os resultados forem considerados homogêneos ($p > 0,1$) ou semi-ponderada, se os resultados forem heterogêneos ($p < 0,1$).

7.2.1 – Potência das vacinas

Para um ensaio ser considerado válido é necessário que:

- a) A análise estatística mostre uma inclinação significativa na curva dose resposta (evidenciado no CombiStats pela presença de pelo menos um asterisco) e não haja desvios significativos da linearidade e paralelismo (evidenciados no CombiStats pela ausência de asteriscos).
- b) As DE50 das vacinas de referência e teste estejam situadas entre a menor e a maior dose aplicadas aos animais.
- c) A DE50 obtida para a vacina de referência permaneça dentro dos limites de confiança de 99%.

Este critério será avaliado lançando-se os resultados do logaritmo da DE50, a cada ensaio realizado, em gráficos de controle de valores individuais (x-chart) e de amplitudes móveis. O intervalo de confiança deverá ser calculado utilizando-se os primeiros 20 resultados, para tanto utilizar o software SPC EXPLORER RT, instalado no Departamento de Imunologia - LVV. Os gráficos devem ser configurados para realizar os testes de desempenho (run tests) descritos na tabela do Anexo F e no POP/INCQS 65.3400.002.

Este procedimento é um controle interno da qualidade (CIQ), os ensaios onde o resultado exceda o primeiro teste de desempenho, ou seja, um ponto além de 3 desvios padrão serão considerados inválidos e o ensaio deverá ser repetido.

- d) O limite inferior de confiança da potência estimada seja maior que 0,62 UI/dose (25% de 2,5 UI/dose) para vacinas de cultivo celular como sugerido por Weisser and Hechler (1997).

7.3 - Interpretação

A conclusão do ensaio deve ser considerada satisfatória quando:

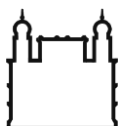
7.3.1 - O ensaio for considerado válido

7.3.2 - Quando a potência da vacina teste for maior ou igual a 2,5 UI/dose para as vacinas produzidas em cultivo celular e demais vacinas purificadas (Brasil, 2010).

7.4 – Critérios para repetição de ensaios

7.4.1- Ensaios invalidados

O ensaio deverá ser repetido quando os resultados forem inválidos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



TÍTULO: Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas contra Raiva	NÚMERO 65.3430-XXX
---	-------------------------------------

7.4.2 – Amostras reprovadas

Se uma amostra de vacina for considerada insatisfatória o ensaio poderá ser repetido (até no máximo três vezes). Desta forma, quando mais de um ensaio for realizado, todos os resultados devem ser combinados pela média geométrica ponderada (obtida no CombiStats).

8. BIBLIOGRAFIA

AUBERT, M. F. A. Methods for the calculation of titres. in: LABORATORY TECHNIQUES IN RABIES, WHO; 4th ed. Geneva, 1996. 476 p. p. 445-459.

BOAS práticas em experimentação animal. In: MANUAL da qualidade. Rio de Janeiro: INCQS. Seção 4.3. (65.3440.002).

BRASIL, Farmacopéia Brasileira, 5a Edição, Volume 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. Soro antirrábico – p1297-8, 2010.

CombiStats v5.0, EDQM – Council of Europe, www.combistats.eu.

COUNCIL OF EUROPE. Assays depending upon quantal responses. (Chapter 5.3. Statistical analysis). In: The European Pharmacopoeia, (2008). 7th ed. Strasbourg, France. p 615-8. 2016a.

COUNCIL OF EUROPE. Combination of assay results. (Chapter 5.3 Statistical analysis). In: The European Pharmacopoeia, (2008), 6th ed. Strasbourg, France.. p 628-30. 2016b.

COUNCIL OF EUROPE. Human Rabies Immunoglobulin. Monograph nº 0723, In: The European Pharmacopoeia, 2015. 8.3th ed. Strasbourg, France. p 4355-6. 2016c.

COUNCIL OF EUROPE. Rabies vaccine for human use prepared in cell cultures (Monograph No. 0216). In: The European Pharmacopoeia, 2008. 6th ed. Strasbourg, France; p 836-8.

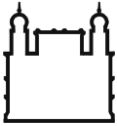
COUNCIL OF EUROPE. Assays depending upon quantal responses. (Chapter 5.3. Statistical analysis). In: The European Pharmacopoeia, 2008. 6th ed. Strasbourg, France. p 580-2.

COUNCIL OF EUROPE. Combination of assay results. (Chapter 5.3 Statistical analysis). In: The European Pharmacopoeia, 2008, 6th ed. Strasbourg, France. p 593-4.

ENSAIO de potência para vacina contra a raiva. In: MANUAL da qualidade. Rio de Janeiro: INCQS, 65.3430.018.

ESTABELECIMENTO de vacina de referência contra raiva. In: MANUAL da qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 4.3 (65.3430.017).

ESTABELECIMENTO de soro antirrábico de referência. In: MANUAL da qualidade. Rio de Janeiro:



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



TÍTULO: Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas contra Raiva	NÚMERO 65.3430-XXX
---	-------------------------------------

ro: INCQS, 65.3430.025.

FARMACOPEIA Brasileira, 5a Edição, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, Vacina Raiva Inativada, p1366-8. 2010.

GRÁFICOS de controle para medidas individuais e amplitudes móveis em ensaios biológicos. In: In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS (65.3400.002).

KAPLAN, M. M. Safety precautions in handling rabies virus. In: LABORATORY TECHNIQUES IN RABIES, WHO; 4th ed. Geneva, p. 3-8. 1996.

MANUTENÇÃO de linhagens de células animais. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 65.3430.031.

MOURA, W.C.; GALLINA, N.M.F; FUCHES, R.M.M.; ROMIJN, P.; LEITE, J.P.G. Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study, Journal of Virological Methods, 154, p. 7-13. doi:10.1016/j.jviromet.2008.09.010, 2008.

MICROSCÓPIO invertido com epi-fluorescência. In: MANUAL da qualidade. Rio de Janeiro: INCQS, PU-3400.004.

PREPARAÇÃO de materiais para esterilização. In: MANUAL da qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 4.3 (65.3220.004).

PROCESSO de limpeza de materiais de laboratório. In: MANUAL da qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 4.3 (65.3220.006).

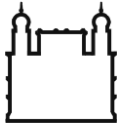
PRODUÇÃO e controle da qualidade de vírus rábico fixo de trabalho. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 4.3 (65.3430.015).

PRODUÇÃO, controle da qualidade e estabelecimento de soro anti-rábico de referência. In: MANUAL da qualidade. Rio de Janeiro: INCQS (65.3400.025).

REGISTRO de dados. In: MANUAL da qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 4.3. (65.1120.033).

SMITH, J. S., YAGER, P. A. & BAER, G. M. A Rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibodies. in: LABORATORY TECHNIQUES IN RABIES, WHO; 4th ed. Geneva, 1996. 476 p. Chp. 15, p. 181-192.

TRIMARCHI, C. V.; RUDD, R. D. & SAFFORD Jr. M. An in vitro neutralization test for rabies antibody. in: LABORATORY TECHNIQUES IN RABIES, WHO; 4th ed. Geneva, 1996. 476 p. Chp 16, p. 193-199.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



TÍTULO:

**Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas
contra Raiva**

**NÚMERO
65.3430-XXX**

TUTORIAL do software de análises de resultados de ensaios – CombiStats. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 4.3. (65.3400.012).

WEISSER, K., HECHLER, U., 1997. Animal Welfare Aspects in the Quality Control of Immunologicals. A Critical Evaluation of Animal Tests in Pharmacopoeial monographs. FRAME, Nottingham, UK, 177–189.

YAGER, ML. MOORE, S. The Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test. in: Current laboratory techniques in rabies diagnosis, research, and prevention. Academic Press. ed C. Rupprecht and T. Nagarajan; p199-215. 2015.

American Type Culture Collection (ATCC), BHK. Available from: <
<https://www.atcc.org/Products/All/CCL-10.aspx>].

ZALAN, E. WILSON, C. & PUKITIS, D. A microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. Journal of Biological Standardization, 1979, 7, 213-220.

9. AVALIAÇÃO DA BILIOGRAFIA

Sem informações.

10. ALTERAÇÕES COM RELAÇÃO À REVISÃO ANTERIOR

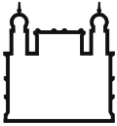
Sem informações.

11. ANEXOS

A. Protocolo padronizado

B. Tabela de doses anestésicas para camundongos

/ANEXO A



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

**TÍTULO:****Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas
contra Raiva****NÚMERO
65.3430-XXX**

Protocolo padronizado para realização do ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas contra Raiva - Folha 1

		Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde					
ENSAIO SOROLÓGICO PARA AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE VACINAS CONTRA RAIVA Protocolo nº ____/____							
1 - Pesagem dos animais.							
Número animais	Faixa peso	% Anim. pesados	no peso	abaixo	acima	Data	Executor
		%				/ /	
2 - Identificação das amostras em teste:							
Amostra	Id.	Página	Potência				
Referência							
Amostra 1							
Amostra 2							
Amostra 3							
Amostra 4							
Amostra 5							
3 - Esquema de diluição das amostras: Vide esquema na página							
Amostra	Grupo	Diluyente	Nº diluições preparadas	Nº diluições testadas	Diluição inicial testada	Diluição final testada	
Referência		1					
Amostra 1		1					
Amostra 2		1					
Amostra 3		1					
Amostra 4		1					
Amostra 5		1					
3.1 - Imunizações							
Data 1ª Imunização	Resp. Diluição	Resp. Imunização	Data 2ª Imunização	Resp. Diluição	Resp. Imunização		
/ /			/ /				
4 - Material e equipamento utilizado:							
Pipeta 1.000 µL:	Diluyente 1 - PBS Lote:						
Pipeta 200 µL:	Diluyente 2: Albumina Bovina 0,75%: Lote:						
Pipeta 5.000 µL:	Diluyente 3:						
Pipeta 10.000 µL:	Gabinete Biossegurança:						
Seringas 3 mL:	Balança:						
Dispensador automático:							
<small>POP 65.3430.XXX - Rev. 00 - Anexo A - Folha 01 CLASSIFICAÇÃO: 542</small>							

/ANEXO A - cont.

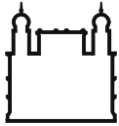
Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil
 Tel (21) 3865-5151 Fax (21) 2290-0915
 www.incqs.fiocruz.br

CLASSIFICAÇÃO

013.1

PÁGINA

21/25



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde





TÍTULO: **Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas contra Raiva**

NÚMERO
65.3430-XXX

ANEXO A - cont.

Protocolo padronizado para realização do ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas contra Raiva - Folha 2


 Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

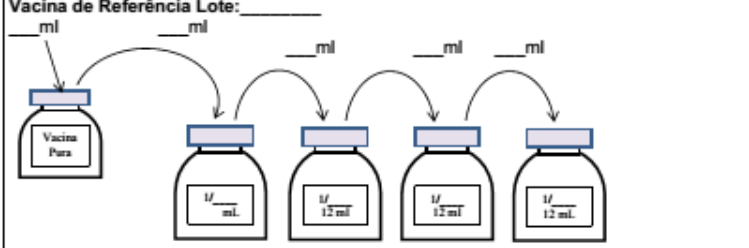

INCQS

ENSAIO SOROLÓGICO PARA AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE VACINAS CONTRA RAIVA Protocolo nº ____/____/____

5. Esquema de reconstituição e diluição de vacinas para o Ensaio de Potência NIH
 Datas das Imunizações: 1ª ____/____/____; 2ª ____/____/____.

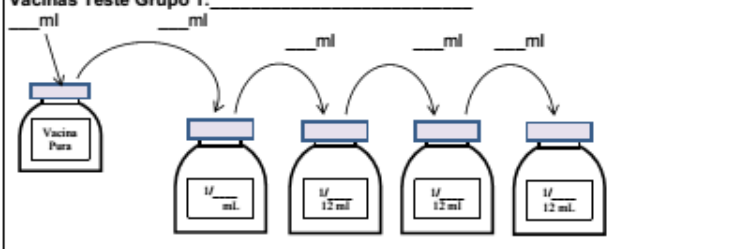
5.1 - Vacina de Referência: lote: _____; Potência: ____ UI/____; Reconstituída com: ____ ml; Potência final: ____ UI/____. Diluições testadas: 1/____; 1/____; 1/____; 1/____. Primeira diluição consistiu da adição de ____ ml de vacina pura a ____ ml de PBS, a seguir as demais diluições fator ____ consistiram da passagem de ____ ml da diluição anterior em ____ ml de PBS. A segunda imunização utilizou:
 Aliquota congelada a ____ °C no equipamento _____;
 Nova amostra reconstituída em ____/____/____.

Vacina de Referência Lote: _____



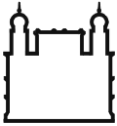
5.2 - Vacina Grupo 1: Amostra(s): _____; Potência: ____ UI/____; Reconstituída com: ____ ml; Potência final: ____ UI/____. Diluições testadas: 1/____; 1/____; 1/____; 1/____. Primeira diluição consistiu da adição de ____ ml de vacina pura a ____ ml de PBS, a seguir as demais diluições fator ____ consistiram da passagem de ____ ml da diluição anterior em ____ ml de PBS. A segunda imunização utilizou:
 Aliquota congelada a ____ °C no equipamento _____;
 Nova amostra reconstituída em ____/____/____.

Vacinas Teste Grupo 1: _____



POP 65.3430.XXX - Rev. 00 - Anexo A - Folha 02
 CLASSIFICAÇÃO: 542

/ANEXO A - cont.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



TÍTULO:

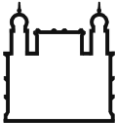
Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas
contra RaivaNÚMERO
65.3430-XXX

ANEXO A - cont.

Protocolo padronizado para realização do ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas contra Raiva - Folha 3

		Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde			
ENSAIO SOROLÓGICO PARA AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE VACINAS CONTRA RAIVA Protocolo nº ____/____/____					
6 - Pesagem dos animais e Anestesia.					
Número animais		% Anim. pesados		Data	
		%		/ /	
				Executor	
7 - Coleta de sangue:					
Amostra		Diluições		Animais/Grupo	
				Amostra coletada/Grupo	
8 - Preparo da Amostra 8.1- Centrifugação e separação Centrifuga refrigerada: _____; Temperatura: _____ °C / 1000 g / 15 minutos. Data: ____/____/____. Responsável: _____.					
8.2- Separação CSB: _____; Responsável: _____.					
8.3- Inativação Banho-maria: _____; Temperatura: 56°C / 30 minutos - Horário: Início: ____ h; Término: ____ h. Responsável: _____.					
9 - Estocagem da Amostra Freezer: _____; Temperatura: _____ °C. Data: ____/____/____. Responsável: _____.					
<small>POP 65.3430.XXX - Rev. 00 - Anexo A - Folha 03 CLASSIFICAÇÃO: 542</small>					

/ANEXO A - cont.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



TÍTULO:

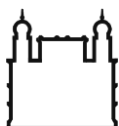
Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas
contra RaivaNÚMERO
65.3430-XXX

ANEXO A - cont.

Protocolo padronizado para realização do ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas contra Raiva - Folha 4

	Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde			
ENSAIO SOROLÓGICO PARA AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE VACINAS CONTRA RAIVA Protocolo nº ____/____/____ Protocolo nº _____				
6 - Critérios de validade do ensaio: Data ____/____/____ Executor: _____				
Critério	Valor ref.	Conclusão		
Regressão	$p < \text{ou} = 0,05$	() Conforme () Não conforme		
Paralelismo	$p > \text{ou} = 0,05$	() Conforme () Não conforme		
Linearidade	$p > \text{ou} = 0,05$	() Conforme () Não conforme		
Referencia	$p > \text{ou} = 0,05$	() Conforme () Não conforme		
Amostra	$p > \text{ou} = 0,05$	() Conforme () Não conforme		
Amostra	$p > \text{ou} = 0,05$	() Conforme () Não conforme		
Amostra	$p > \text{ou} = 0,05$	() Conforme () Não conforme		
Amostra	$p > \text{ou} = 0,05$	() Conforme () Não conforme		
Amostra	$p > \text{ou} = 0,05$	() Conforme () Não conforme		
DE ₅₀ Ref*	Log DE50			
	Log LIC			
	Log LSC			
* - Controle sistemático Teste () Validado - () Invalidado, frente aos critérios descritos no POP INCQS Nº 65.3430.018.				
7. Resultados:				
Amostra	Resultados	%LIC	%LSC	Conclusão
Referencia DE ₅₀				
Amostra	UI/dose			() Conforme () Não conforme
Amostra	UI/dose			() Conforme () Não conforme
Amostra	UI/dose			() Conforme () Não conforme
Amostra	UI/dose			() Conforme () Não conforme
Amostra	UI/dose			() Conforme () Não conforme
Data: ____/____/____ Responsável: _____				
<small>POP 65.3430.XXX - Rev. 00 - Anexo A - Folha 04 CLASSIFICAÇÃO: 542</small>				

/ANEXO B - cont.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

**TÍTULO:****Ensaio Sorológico para Avaliação da Potência de Vacinas
contra Raiva****NÚMERO
65.3430-XXX****ANEXO B**

Tabela de doses anestésicas para camundongos

Peso (g)	Ketamina 50%		Xylasina 2%	
	mg	mL	mg	mL
20	3,00	0,030	0,20	0,010
25	3,75	0,038	0,25	0,012
30	4,50	0,045	0,30	0,015
35	5,25	0,053	0,35	0,018
40	6,00	0,060	0,40	0,020
45	6,75	0,068	0,45	0,023
50	7,50	0,075	0,50	0,025

APÊNDICE C – ARTIGO INTITULADO “DEVELOPMENT AND PRE-VALIDATION OF A QUANTITATIVE MULTI-DOSE SEROLOGICAL ASSAY FOR POTENCY TESTING OF INACTIVATED RABIES VACCINES FOR HUMAN USE” - JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS 263 (2019) 54–59

Journal of Virological Methods 263 (2019) 54–59

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviromet




Development and pre-validation of a quantitative multi-dose serological assay for potency testing of inactivated rabies vaccines for human use

Wildeberg Cál Moreira^{a,*}, Jéssica F.S. Freitas^a, Nathalia S. Machado^a, Antônio Eugênio Castro Cardoso Almeida^a, Wlamir Corrêa de Moura^{a,b}

^a Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Av. Brasil, 4365, Manguinhos, CEP: 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BruCVAM), INCQS, FIOCRUZ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Potency assay
Rabies vaccine
Serological assay
mRFFIT
Pre-validation

ABSTRACT

It is mandatory to ensure the quality of biological products used in the prevention of rabies, a zoonosis with nearly 100% lethality. Fifteen million people receive post-exposure prophylaxis yearly. The vaccine batches are assessed by the National Institutes of Health (NIH) test which has several disadvantages such as significant variability and animal welfare issues. The estimation of immunogenicity based on titration of neutralizing antibodies (NA) is not applied to the human vaccine yet. Despite this, a satisfactory concentration of NA (0.5 IU/ml) can be used as a predictor of the clinical efficacy and for estimating rabies vaccine potency. The objective of this study was to develop and pre-validate a Serological Potency Test (SPT) using the modified Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (mRFFIT) to determine the potency of rabies vaccines for human use, demonstrating its relevance and reliability. The results show good agreement between the potencies determined by the SPT and the NIH test. The assay was able to distinguish between potent and sub-potent lots of vaccines. The results demonstrated that SPT is a viable candidate for validation and inclusion in pharmacopoeias as a reduction and refinement for the NIH test.

1. Introduction

Rabies is an anthroozoonosis transmitted to humans by Rabies lyssavirus, Order Mononegavirales, family Rhabdoviridae. It can affect all mammals and is characterized by acute encephalitis that can lead to death in almost 100% of the cases (Rupprecht et al., 2002; Acha and Szyfres, 2003; Consoles and Bolzan, 2007; ICTV, 2011). Although it was one of the first human diseases to have an experimentally developed vaccine used successfully in 1885 (Vodopija and Clark, 1991), the World Health Organization (WHO) lists rabies among the top ten causes of human deaths in the world (WHO, 2014).

Historically, biologicals such as vaccines have been predominantly produced by complex biological processes (bacterial fermentation, cell culture, and embryonated eggs), from which reproducibility is challenging and carried out by potency verification methods that are as old as the first vaccines (Ranhein et al., 2015).

Rabies vaccines for human use must have a minimum potency of 2.5 IU/dose and the viral strain must demonstrate adequate immunogenicity (potency) for humans. For vaccine batch release purpose,

batches are assessed by viral identification, sterility and viral titers (Brasil, 2010a; WHO, 2007; Council of Europe, 2015).

The potency assay evaluates the immunogenicity of rabies vaccines versus a reference vaccine by the NIH method (Brasil, 2010a; Wilbur and Aubert, 1996; Council of Europe, 2015). Briefly, this *in vivo* method consists of two intraperitoneal (ip) immunizations of mice groups seven days apart, followed by an intracerebral (ic) challenge with a standard virus (challenge virus standard - CVS). After the challenge, animals are monitored for 14 days and the relative potency of the test vaccine is calculated by comparing its 50% effective dose (ED50) with the ED50 of the reference vaccine (Wilbur and Aubert, 1996). Despite its capability to discriminate between potent and sub-potent lots, the NIH test has significant drawbacks such as inaccuracy, poor reproducibility, never been properly validated and severe ethical and animal welfare issues. To minimize or avoid the pain and suffering associated with the ic procedure, mice should be anesthetized (Hedrich and Bullock, 2004).

The WHO recommends that newly developed rabies vaccines must be submitted to clinical trials (WHO, 2007) and for the clinical evaluation of rabies vaccination and licensing, the vaccine must present a

* Corresponding author at: Av. Brasil, 4365, Manguinhos, CEP: 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
E-mail addresses: wildeberg.moreira@incqs.fiocruz.br (W.C. Moreira), jessica.freitas@incqs.fiocruz.br (J.F.S. Freitas), nathalia.machado@incqs.fiocruz.br (N.S. Machado), eugenio.almeida@incqs.fiocruz.br (A.E.C.C. Almeida), wlamir.moura@incqs.fiocruz.br (W.C.d. Moura).

<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.10.003>
Received 26 June 2018; Received in revised form 5 October 2018; Accepted 10 October 2018
Available online 25 October 2018
0166-0934/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

minimum potency of 2.5 IU per dose, inducing adequate neutralizing antibodies (NA) titers in humans which are evaluated by either the Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) or the Fluorescent Antibody Virus Neutralization Test (FAVN). An antibody titer of at least 0.5 IU/ml on days 14 and 28 or 30 after vaccination is generally considered appropriate. Therefore, the concentration of NA can be used as a clinical efficacy predictor of this product. Immunogenicity tests are already applied to veterinary vaccines, as an alternative to the challenge test, with immunization followed by titration of NA (Krümer et al., 2009, 2010; Council of Europe, 2013).

Validation of potency assays for vaccines is typically based on (1) the type of vaccine tested and (2) on specific details of analytical procedures, in which potency may mean antigen content or, more typically, biological activity. It consists of demonstrating the relevance and reliability of a method or process for a specific purpose (Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD), 2005; International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of pharmaceuticals for Human Use (ICH), 2005).

The validation process usually evaluates accuracy (or trueness), precision (repeatability and intermediate precision), specificity, detection and quantification limits, linearity, and measuring interval. The phases until test implementation are the pre-validation, which consists of an initial evaluation aiming at the adjustment, optimization, and standardization of the protocol and standard operational procedures. In this phase, preliminary relevance and reliability data are obtained to justify the formal validation study or validation itself (Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD), 2005).

The pre-validation process compares the candidate test with the traditional assay to demonstrate reliability by determining assay precision, by means of inter-assay variability (intra- and inter-assay precision) and demonstrating the relevance. The results are compared to determine either sensitivity or agreement and the ability to differentiate potent from sub-potent batches. Subsequently, its transferability is assessed (Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD), 2005).

Although some practices are used to reduce animal suffering such as the use of anesthetic agents, the NIH test, the only test accepted for releasing rabies vaccine lots for human use, is not in accordance with current animal welfare recommendations and the 3Rs strategy. In addition, the WHO recommends evaluating vaccines by the immunogenicity that is accepted for veterinary vaccines. Based on this, this research aims to develop and pre-validate a Serologic Potency Test (SPT) as a reduction and refinement of the NIH method.

2. Materials and methods

To develop and pre-validate the SPT, the same vaccine samples were used to perform the SPT and NIH test and results were compared. The SPT performance was submitted to statistical analysis to demonstrate its relevance and reliability.

2.1. Vaccine samples

Eight batches of human rabies vaccine (Rabvac - Sanofi Pasteur, França) approved in the NIH test were selected and labeled from A to H (Table 1). The freeze-dried Rabvac contains 0.5 ml diluent in one-dose vials, and is produced in Vero cells using the Wistar PM/WI38 1503-3 M strain of rabies virus, inactivated by betapropiolactone and purified. The minimum potency required is 2.5 IU/ dose. After reconstitution, five batches (A, B, D, E and H) were submitted to heat treatment $52^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ for 48 h \pm 10 min to obtain sub-potent vaccines (Table 2).

2.2. Reference vaccine

The Brazilian National Rabies Reference Vaccine BR014 (Refvac) is a commercial lot manufactured in October/2009 and it is the same

Table 1
Rabies vaccine samples.

Vaccine	Potency (IU/ dose)	
	INCCQS	Manufacturer
Vac A*	15.0	4.2
Vac B*	19.0	14.4
Vac C	8.0	4.8
Vac D*	nt	8.7
Vac E*	nt	6.8
Vac F	> 2.5	17.6
Vac G	nt	4.4
Vac H*	12.3	15.0

* Batches were submitted to heat treatment. nt- not tested.

product of the vaccine samples with the same strain of rabies virus. The BR014 was certified by the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCCQS), Fiocruz, against the 6th International Standard provided by the National Institute of Biological Standards and Control (NIBSC, UK), with an attributed titer of 9.0 IU per vial, according to the WHO recommendations (WHO, 2006).

2.3. Laboratory animals

Swiss Webster mice (outbred strain), male and female, about 3–4 weeks old, weighing 10–15 g, were provided by Fiocruz/ Institute of Biomedical Science and Technology, Brazil. The animals were separated by gender, housed in cages with water and food ad libitum, kept under controlled temperature and humidity ($22 \pm 1^{\circ} \text{C}$, about 50% relative humidity and 12 h photoperiod).

For the SPT, mice were separated into three groups of five animals each for testing three dilutions of the vaccine samples. For the NIH test, 16 mice were used for each of the three vaccine dilutions and three groups of 10 mice were used for virus titration. The study was approved by the Fiocruz Institutional Animal Care and Use Committee (LW-17/16).

2.4. NIH potency test (NIH)

Vaccine samples were tested by NIH as described in the Brazilian Pharmacopoeia (Brasil, 2010a). The assay consisted of two ip immunizations (0 and 7 day), with 0.5 ml of the dilutions (samples A–E and H: 1/25, 1/125 and 1/625; sample E assay 03/18: 1/250, 1/1250 and 1/6250; sample F assay 07/18: 1/1100, 1/5500 and 1/27500; sample G: 1/200, 1/1000 and 1/5000) of the samples or Refvac (1/50, 1/250 and 1/1250). On day 14, the challenge was performed by ic route with 32 50% lethal dose (LD50)/ 0.03 ml of challenge virus standard (CVS). The CVS was titrated simultaneously. The animals were observed for 14 days and upon development of rabies signs, humane endpoints were applied (Brasil, 2010a). The relative potencies of vaccine lots can be seen in Table 2.

2.5. Serological potency test for rabies vaccines of human use (SPT)

The SPT protocol was adapted directly from the NIH for direct comparison. The ic challenge step was replaced by cardiac puncture bleeding under anesthesia and the number of animals was reduced from 16 to 5 per dilution. No viral titration was performed. For determining the NA titers against rabies, a total of 344 sera from SPT in 11 assay runs, vaccinated mice were evaluated by modified rapid fluorescent focus inhibition test adapted for 96-well microplate (mRFFIT) (Table S2). On day 14 after immunization, the animals were bled. After retraction of the clot, the blood samples were centrifuged at 200 g for 15 ± 1 min, the sera transferred to sterile cryovials, inactivated at $56 \pm 1^{\circ} \text{C}$ for 30 ± 1 min, and kept at $-20 \pm 1^{\circ} \text{C}$ until being individually tested.

Table 2
Relative test and NIH against BR014.

Vaccine	SPT ap-WHO ¹				NIH			
	Regular		Heat treatment ²		Regular		Heat treatment	
	Potency (IU/dose)	Confidence intervals (%)	Potency (IU/dose)	Confidence intervals (%)	Potency (IU/dose)	Confidence intervals (%)	Potency (IU/dose)	Confidence intervals (%)
A	3.61	19.2–500.9	0.00 [†]	–	15.09	42.3–260.7	0.00 [†]	–
B	6.39 [*]	30.6–515.2	0.00 [†]	–	19.44	43.0–248.2	0.00 [†]	–
C	6.62	13.8–927.2	0.25	56.9–175.8	8.13	43.4–240.9	0.02	0.8–618.3
D	6.39	30.6–515.2	0.00 [†]	–	8.70 [‡]	46.0–229.7	nt	–
E	9.46	21.2–535.1	0.00 [†]	–	6.80 [‡]	50.0–198.5	0.05	2.2–427.5

Potency determination approach ¹cut-off ≥ 0.5 IU/ml as the minimum seroconversion titre. Acceptance criteria: significant slope in the dose response curve; there are no significant deviations from linearity and parallelism; the ED50 of the reference and test vaccines lies between the lowest and the highest dose applied to the animals; the ED50 obtained for the reference vaccine remains within the 99% confidence limits in the control chart, the potency ≥ 2.5 IU/dose and the lower confidence limit of the estimated potency is greater than 0.62 IU/dose (25% of 2.5 IU/dose).

^{*}Sample with non-conform potency was repeated. [‡]Potency calculated by the manufacturer. ²Heat treatment 52° \pm 1 °C for 48 h \pm 10 min. [†]The confidence interval could not be determined. nt – not tested.

The serum samples were two-fold serially diluted from 1/4 to 1/32 and the working virus suspension was diluted to contain 200–50% focus-forming doses. The plates were incubated at 36.5 \pm 0.5 °C in a humidified incubator with 5% CO₂ for 90 min. Subsequently, BHK-21 at a concentration of 3.5 \times 10⁵ cells/ml was added and the plates were incubated for 22 h. The plates were washed with PBS, fixed with 80% acetone and incubated with the commercial rabies nucleocapsid conjugate (Bio-RAD, France) at 37 °C for 30 min. After washing and drying, the plates were analyzed under UV microscope to determine the number of positive foci per well (Brasil, 2010b; Moura et al., 2008). The NA titer was calculated using the probit analysis in CombiStats 5.0 (EDQM) and expressed in IU/ml.

In order to choose the most suitable calculation method, the relative potencies were determined in SPT with three calculation approaches. The WHO approach (ap-WHO), with a cut-off of ≥ 0.5 IU/ml as indicative of seroconversion titer (WHO, 2005); a model of parallel lines with the absolute NA titer in IU/ml of each mouse (ap-TNA) was used. In the third, called the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) approach, the cut-off ≥ 0.12 IU/ml (Manning et al., 2008), was adopted as indicative of seroconversion.

The minimum potency requirement adopted for the SPT was ≥ 2.5 IU/dose, as in the NIH.

2.6. Statistical analysis

The Microsoft[®] Excel, GraphPrism[®], MedCalc[®], and CombiStats[®] were used for the statistical analysis. The potency results were logarithmic transformed to improve the normal distribution fitting when necessary.

The weighted least squares method and probit analysis were used for transforming the sigmoid dose-response curve into a straight line that can be further analyzed by regression through either least squares or maximum likelihood (Finney, 1971).

The normal distribution of the results was evaluated by the Omnibus D'Agostino & Pearson normality test (Miot, 2017). Similarity of the corresponding potencies between the SPT and NIH were estimated using: student *t* test for paired samples, analysis of variance (ANOVA), simple linear regression, correlation, Cohen Kappa coefficient, Lin correlation coefficient (*pc*), and confidence intervals (CI).

In the SPT relevance study, student *t* test, ANOVA, Pearson correlation, sensitivity, specificity, accuracy, positive and negative (PPV and NPV) predictive values were applied for describing the SPT performance while the Cohen Kappa agreement index evaluated the concordance of the results with NIH and mainly its ability to differentiate potent from sub-potent batches. The Cochran C test was performed to determine homogeneity of variances.

The reliability was determined by calculating the intra- and inter-assay variances from the logarithmic transformed NA titers of the Refvac by dilution in three runs of mRFFIT. Intra- and inter-assay geometric coefficients of variation (gCV%) were obtained. The SPT precision was also demonstrated by comparing it with the potencies obtained in NIH by the *pc* and 95% CI.

3. Results

3.1. Standardization of the serological potency test

The vaccine samples were submitted to the SPT and the sera of immunized mice were titrated to determine the vaccine relative potency and to demonstrate SPT relevance and reliability. The ap-WHO presented the most suitable calculation for relative potencies and it was chosen (Supplemental Table S1).

3.1.1. Antibody titration by mRFFIT

Supplemental Table S2 shows the raw data for the *in vitro* rabies NA titers of 344 serum samples from vaccinated mice. Aiming at pre-validating the SPT, 11 test runs were performed and the data were used to calculate the potency by the SPT. The SPT results for the samples rendered sub-potent by heat treatment were in agreement with the NIH test. The NIH test was not performed with the sub-potent D vaccine (Table 2).

3.2. Pre-validation of the serological potency test

3.2.1. Relevance

The ap-WHO was used in material and methods by statistical analyses. The resulting of NIH and SPT were compared by one-way ANOVA to determine whether there was a significant difference between them and there was no statistically significant differences between NIH and SPT (*F* 3.067; *p* 0.1125) serological potency, although a trivial heterogeneity was observed between the absolute values of the vaccine relative potencies (*F* 4.096; 0.0079). The homogeneity of variances between SPT and NIH tests for vaccines A, B and C was considered homogeneous (*C* 0.7256).

A relevance study was performed with the potencies shown in Table 2. In this evaluation, all the results were concordant when the relative potency was calculated in SPT. The relative potencies were not significantly different as shown by the paired student *t* test at 5%. The comparison between SPT and NIH showed agreement between the results, including for sub-potent vaccines. The difference between the means was -0.1094, with a standard deviation of 0.2308 (*t* 1.423, *p* 0.2019, *r* 0.9267).

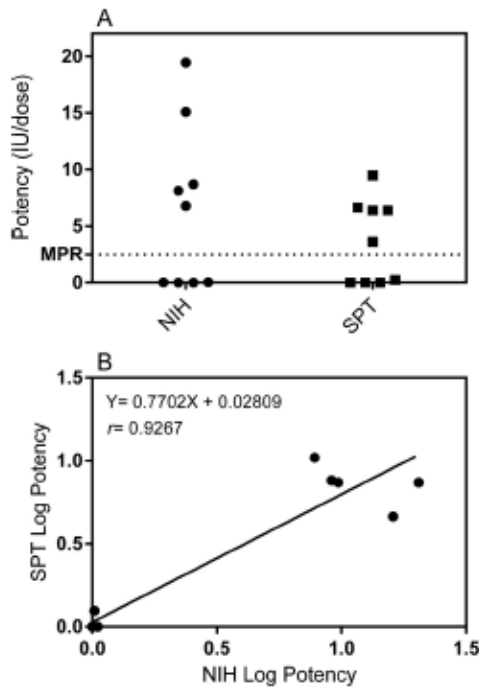


Fig. 1. (A) The relative potency calculation approaches; MPR - minimum potency requirement (≥ 2.5 IU/dose). Pearson correlation of the potency logarithms (B) between SPT ap-WHO and NIH test.

Fig. 1 shows the relative potency by NIH and SPT of the eight batches of Rabvac (samples A–H) plus the Refvac, totaling nine samples (Fig. 1A). The potency determination by SPT showed that five batches were compliant (≥ 2.5 IU/dose). The Pearson coefficient was significant ($p < 0.05$) while SPT and NIH were highly correlated with $r = 0.9267$ ($r^2 = 0.8589$) and linear regression equation $Y = 0.7702X + 0.02809$ (Fig. 1B).

After categorizing concordant (pass) and discordant (fail to pass) samples, the SPT and NIH results were compared for determining sensitivity, specificity, accuracy as well as positive (PPV) and negative (NPV) predictive values for profiling SPT performance. In this comparison all indexes found were 100%, demonstrating a perfect agreement between SPT and NIH test results. The Cohen Kappa indexes for the SPT results were also verified using the categorized data and the relationship between SPT and NIH presented a great concordance strength (Kappa 1.0). The SPT precision was demonstrated by the ρ_c considered satisfactory (0.88) while Pearson coefficient (ρ) was excellent (0.93). The SPT had better performance, displaying 93% accuracy under ideal conditions, by the Lin Concordance Coefficient, thus agreeing with the NIH when identifying sub-potent batches. Also, trueness (capacity to identify the true value) was evaluated as excellent (0.95) (Table 3).

The ρ_c graph of the SPT and NIH are shown in Fig. 1B. A satisfactory agreement is observed, demonstrating a higher concordance and correlation. The CI of vaccine potencies for the NIH and SPT are plotted in Fig. 2. To demonstrate the calculation precision, the lower and upper confidence (25% and 400%) intervals for the calculated potencies are plotted as well, as recommended for the NIH test (Brasil, 2010a). The

Table 3

Summary of statistical analysis of the serological potency test against the NIH test.

Descriptors	Values	Confidence intervals
Sensitivity	100.00	47.82–100.00
Specificity	100.00	39.76–100.00
Positive Predictive Value	100.00	–
Negative Predictive Value	100.00	–
Accuracy	100.00	66.37–100.00
Kappa ^a	1.0000	–
Concordance (%)	100.00	–
ρ_c^b	0.88	0.63–0.96
Precision (Pearson ρ)	0.93	–
Trueness	0.95	–

^a Cohen's Kappa Coefficient.

^b Lin's Concordance Coefficient. Source on line available in: <https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa2/> and <https://www.medical.cornell.edu/diagnostic-test.php>.

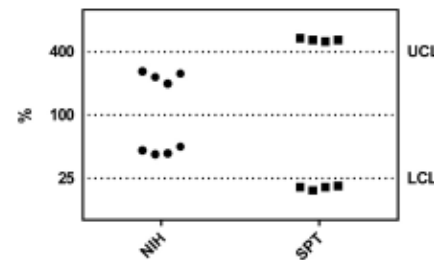


Fig. 2. 95% Confidence intervals upper (UCL) and low (LCL) control limits of the relative potencies determined in the NIH and Serologic Potency Test. The sample C, which was excluded due to high variability, is not represented in these figures. $n = 4$.

vaccine C interval was very wide, therefore, this outlier sample was excluded due to high variability, allowing to elaborate a more didactic chart. It was observed that the potency values calculated in SPT were outside the CI.

3.2.2. Reliability

Pools of sera from three different dilutions (1:50, 1:250 and 1:1250) of the Refvac from two independent SPT assay runs (01 and 02/17) were tested in mRFFIT in three new assay runs (SPT 06, 08 and 09/18). The results were used to evaluate the reliability by determining the intra- and inter-assay precisions. Intra- and inter-assay variances of the NA titer logarithms were calculated by dilution. The intra-assay gCV% of 31.99 (SPT 01/17) and 31.65 (SPT 02/17) and inter-assays gCV% of 31.82%.

4. Discussion

The present study was carried out to pre-validate a serological potency test (SPT) for human rabies vaccines, in consonance with other researchers (Krämer et al., 2013). The SPT uses fewer animals ($n = 15$) compared to the NIH test ($n = 48$), providing a considerable reduction (69%) of the use of animals. In addition, a refinement is achieved by replacing the ic challenge by blood sample collection under anesthesia and reducing the test duration by at least two weeks.

Three different potency calculation approaches were used to compare the NIH and SPT results. The calculation using the ap-WHO produced better agreement between SPT and NIH, when the interpretation was based on an indirect quantal endpoint with all or nothing response (seroconversion or no seroconversion). This was based on the WHO

recommendation of 0.5 IU/ml rabies neutralizing antibodies titer as the clinical predictor of vaccination response (WHO, 2007). In all runs in which SPT ap-WHO was used, valid assays were obtained and this approach was chosen for the pre-validation study.

The SPT relevance had great sensitivity, specificity, accuracy, PPV and NPV, indicating a perfect performance. The correlation coefficient (r 0.9267) showed high agreement with NIH as observed by other researchers for *in vitro* assay (ELISA) (Gamoh et al., 1996; Perrin et al., 1999; Gibert et al., 2013; Morgesaux et al., 2017). The SPT also had a higher correlation compared to the fluoroimmunoassay test (Lin et al., 2017) and other serological tests (Krämer et al., 2009; Winsnes et al., 2003; Hendriksen et al., 1991). A few differences were observed when comparing the relative potencies obtained by SPT and NIH. However, full compliance of absolute potency values cannot be expected due to the high lack of accuracy inherent to animal and cell assays (Krämer et al., 2013; Stokes et al., 2012; Schrock, 2012; Rieder et al., 2010). Despite this, the SPT and NIH results were highly correlated as required by Stokes et al. (2012).

A modern approach for comparing assays is the understanding that the substitute method should not be required to have a significant correlation with the reference method, since the NIH has inherent variability. The new test should agree with the clinical potency of the vaccine and should be able to discriminate between potent and sub-potent lots. This is why some authors refer to “agreement” rather than “correlation” (European Partnership for Alternative Approaches (EPAA, 2012), although many studies still use correlation as a method of analysis (Krämer et al., 2009, 2013; Morgesaux et al., 2017). As the NA titer can be used as a clinical efficacy predictor of rabies vaccines in humans (WHO, 2005), the SPT can directly predict the vaccine clinical potency, a requirement referred by the EPAA (2012).

The SPT sensitivity was higher than that observed by Chabaud-Riou et al. (2017) in serological assays using ELISA, and the 94% reported by Sigillot-Claude et al. (2015). This high sensitivity revealed one of the major SPT advantages regarding recognizing rabies antigen as identified by other researchers (Sigillot-Claude et al., 2015). Another important factor already mentioned by others is the different nature of endpoint used in each test NA titers in SPT versus survival rates in NIH (Krämer et al., 2013). In this matter, although it clearly influenced SPT, we add that the method uses probit analyses for potency determination, as NIH, minimizing this effect.

The SPT results of untreated vaccines were examined in conjunction with the sub-potent samples. The use of sub-potent products or borderline samples is important to assess the methodology (Milne and Buchheit, 2012). Future validation studies should include borderline samples classified by NIH to assess the SPT sensitivity. The SPT and NIH results were concordant, i.e., the method was able to distinguish between potent and sub-potent batches, and in agreement with NIH as previously described (Krämer et al., 2013; Gibert et al., 2013) but in disagreement with previous studies (Servat et al., 2015) in which a serological potency assay using the mRFFIT and FAVN tests failed to identify regular and sub-potent lots. Other groups found only satisfactory agreement for identifying nonconforming lots (Morgesaux et al., 2017; Chabaud-Riou et al., 2017). Some researchers have found sensitivity indexes varying from 55 to 68% (Servat et al., 2015), and from 47 to 90% (Krämer et al., 2010), both lower than the value observed in this study.

Differences were observed between the individual responses of the mice in the test vaccine and VacRef groups, where there was a better response in seroconversion. In particular, significant differences may indicate a change in the immune status of the mice or in other aspects of animal husbandry (van der Ark et al., 2000). High, low, and non-responder animals were observed in the present study. Non-responders were found primarily in animal groups vaccinated with lower vaccine doses as previously observed (Krämer et al., 2013). The exclusion of non-responders may influence the test result, since this failure may be not entirely intrinsic to the animal, but may be due to a sub-potent

vaccine (Krämer et al., 2010).

There is a gap in the detection of true non-responders, raising questions about a given vaccine batch having low potency or the animal being non-responder. Cellular kinetics studies are necessary to complement and identify true non-responders as suggested by some researchers (Bordignon et al., 2002), thus determining with confidence how many individuals can be discarded from the potency calculations.

The SPT relevance could be demonstrated by the perfect performance (The United States Pharmacopoeia (USP, 2017). The Cohen Kappa coefficient indicated great concordance strength of SPT when adopting the concordance tendency rather than the correlation (Stokes et al., 2012; Schiffelers et al., 2014).

The SPT accuracy of 100% obtained from sensitivity calculation was higher than previously found, with CI comparable to that of ELISA (Chabaud-Riou et al., 2017). In the present study, to compare SPT and NIH directly, SPT was performed as a direct adaptation of the NIH protocol, including dose range, as used in INOQS, but only 5 mice per dilution were used in 3 dilutions per assay. The CIs were broader than in NIH, differing from those found by other authors (Krämer et al., 2013). This result shows the need for adjusting the dose (dilutions) range to be used in the SPT, in order to improve the similarity of responses between reference and test vaccines, a basic assumption for biological assays. Once the proof of concept was established, the method can be transferred to at least one additional laboratory with the adoption of a fourth dose which could resolve this adjustment.

This wider CIs may be also probably explained by the variation within the group of animals in SPT. Some mice developed titers higher than others in the same group and in the Refvac group, which is in accordance to previous studies (Krämer et al., 2009), NIH is also influenced by the variability of individual immune responses although not as obvious as in the SPT. Another determinant factor for the wider CIs found was that the reference standard used in the SPT proposed here was calibrated in the NIH. Therefore, prior calibration of the standards in the SPT itself is strongly recommended for a future validation study.

The sample failure to reach minimum potency requirements was readily recognized, demonstrating SPT relevance. This aspect is of particular importance with regard to the release of anti-rabies vaccine batches (Krämer et al., 2009).

Reliability is a pre-requisite for the validity of serological assays due to its ability to estimate the vaccine protective activity, which was readily obtained with the proposed SPT (Hendriksen, 1995). The assay precision assessed by the inter-assay geometric coefficients of variation was about 30%, indicating the good performance of SPT, and considered adequate (Kostense et al., 2012). Researchers have previously reported intra-assay precision varying from 6.1 to 35.5% and inter-assay from 8.6 to 37.6% per laboratory for a Pertussis Serological Potency test (van der Ark et al., 2000); similar values were found for the SPT, 31.99–31.65% and 31.82% for intra- and inter-assay variation, respectively.

In conclusion, the SPT is an accurate, specific and sensitive model for estimating potency and confirming compliance with specifications of rabies vaccines for human use and it is a candidate test for future research and validation. The assay was able to distinguish between potent and sub-potent vaccine lots. There was satisfactory agreement between the corresponding potency in the NIH confirming preliminary relevance and reliability data. It can also reduce test duration, streamlining batch release and improving animal welfare, while ensuring the efficacy of human vaccines.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

APÊNDICE D – ARTIGO INTITULADO “VERIFICATION OF THE RABIES VIRUS GLYCOPROTEIN LOWER LIMIT OF IMMUNOGENICITY BY SEROLOGICAL ASSAY” - JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS 264 (2019) 31–37

Journal of Virological Methods 264 (2019) 31–37

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviromet






Verification of the rabies virus glycoprotein lower limit of immunogenicity by serological assay

Wildeberg Cál Moreira^{a,*}, Nathalia S. Machado^a, Jéssica F.S. Freitas^a, Antônio Eugênio Castro Cardoso Almeida^a, Wlamir Corrêa de Moura^{a,b}

^a Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Av. Brasil, 4365, Manguinhos, CEP: 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), INCQS, FIOCRUZ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Human rabies vaccine
Glycoprotein
Immunogenicity
mRFFIT
ELISA

ABSTRACT

Rabies lethality is close to 100% and annually 15 million people receive post-exposure prophylaxis. Testing for vaccines against this zoonosis should ensure its quality. A standardized test by the National Institutes of Health (NIH) test, based on mice immunization and challenge, has been used to determine the potency of vaccine lots. It has several disadvantages, the main one being its significant variability. Several in vitro methods like an Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) have been proposed based on the quality and quantity of glycoprotein (Glpn) of rabies virus, but may also present limitations such as low sensitivity, instability and imprecision. The estimate of immunogenicity based on neutralizing antibody titer (Nab) evaluated by a serological test (ST) such as the Modified Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (mRFFIT), is not yet effectively applied for human vaccine. Nevertheless, a Nab concentration can be used as a predictor of clinical efficacy of this product in vaccinated humans, so, that can be applied in estimating the vaccine potency. The aim of this study was to verify the lower limit of immunogenicity of the viral Glpnt content in mice using mRFFIT. The lower Glpnt content by ELISA able to induce Nab response was determined. The results were correlated and demonstrated that ST was able to determine the Glpnt immunogenicity lower limit. Our findings suggest that a test based on rabies Nabs may represent an additional alternative for the evaluation of rabies vaccines.

1. Introduction

Rabies is an almost 100% lethal zoonosis transmitted to humans by the inoculation of rabies viruses (RABV), which are members of the *Rabies lyssavirus* genus, which belongs to the Rhabdoviridae family and Mononegavirales order (Rupprecht et al., 2017; ICTV, 2011). Almost all vaccines are based on the functional aspects of G glycoprotein (Glpn), the major antigen of the virus that confers immunity against lethal infection. Antibodies exert their effect by extracellular virus neutralization, complement-mediated lysis of infected cells, and antibody-dependent cytotoxicity (Mattos et al., 2001). The antigenicity of Glpnt is conferred by two dominant antigenic sites (II and III), composed of 20 amino acids out of a total of 505 (Dietzschold et al., 1990; Benmansour et al., 1991).

Human rabies vaccines have their potency assessed by the National Institute of Health (NIH) test (Seligmann, 1966) and must have 2.5 IU/dose as minimum potency (Brasil, 2010a). Batches are submitted to viral identification, sterility and viral titers. In addition, the viral strain must have demonstrated adequate immunogenicity for humans (Brasil, 2010a; Council of Europe, 2015).

The first potency test in mice described was the Habel test (Habel, 1966), which was originally developed in 1944, and it was progressively replaced by NIH test. This is an in vivo method consisting of intraperitoneal (ip) immunization of mice groups, followed by an intracerebral (ic) challenge with standard virus (CVS). The animals are monitored for 14 days post challenge and the relative potency is calculated by comparing their mean effective dose or 50% (ED50) with the ED50 of a reference vaccine (Wilbur and Aubert, 1996).

In the last decades, several antigen and serological quantification models have been developed as potential alternatives for the activity assay. An example of this is the serologic assay based on fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for inactivated veterinary vaccine (Krämer et al., 2009, 2010). The European Pharmacopoeia proposes two methods for determining the potency of this same vaccine: (i) the

* Corresponding author.
E-mail addresses: wildeberg.moreira@incqs.fiocruz.br (W.C. Moreira), nathalia.machado@incqs.fiocruz.br (N.S. Machado), jessica.freitas@incqs.fiocruz.br (J.F.S. Freitas), eugenio.almeida@incqs.fiocruz.br (A.E.C.C. Almeida), wlamir.moura@incqs.fiocruz.br (W.C.d. Moura).

<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.11.005>
Received 31 July 2018; Received in revised form 6 November 2018; Accepted 7 November 2018
Available online 15 November 2018
0166-0934/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

classical challenge test and (ii) the titration of neutralizing antibodies (Nab) induced after mice vaccination, revealed by RFFIT (Council of Europe, 2013). Although the method based on Nab is faster and less painful for animals, it is still not widely used and there are only few data about the agreement with the classical method (Fitzgerald *et al.*, 1978; Krümer *et al.*, 2009). Another disadvantage is that this test is not able to determine the potency of a vaccine. In Brazil, the challenge method and determination of immunogenic activity are applied to rabies vaccine (Brasil, 2010a). For inactivated veterinary vaccines, the Agriculture Ministry currently uses the NIH test (Brasil, 1988).

Antigen quantification models anticipate total animal replacement and measure the amount of antigen or immunogen of the vaccine. These include the single radial immunodiffusion assay (Ferguson *et al.*, 1996), which was accepted in the batch release (Bruckner *et al.*, 2003), the antibody binding test (Arko *et al.*, 1973) and various Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) protocols (Perrin *et al.*, 1990; Rooijackers *et al.*, 1996; Gamoh *et al.*, 1996). Among these, there is an ELISA used by the National Control Laboratory of the National Agency for the Safety of Medicines and Health Products of France (Agence National de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé) to quantify the viral Gp1₂ in vaccines without adjuvant (Stokes *et al.*, 2012). Several ELISA assays for rabies vaccine potency have been proposed as alternatives to the NIH test (Perrin *et al.*, 1990; Rooijackers *et al.*, 1996; Gamoh *et al.*, 1996). Others are still under development, such as ELISA for viral G-protein in human anti-rabies vaccine without adjuvant (Morgeux *et al.*, 2017; Chabaud-Riou *et al.*, 2017). These methods for rabies G-protein estimation using monoclonal antibodies directed against site III (Nagarajan *et al.*, 2006; Gilbert *et al.*, 2013) or site II (Gamoh *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1998) of this protein.

However, there are still several scientific suspicions for the application of serological or antigen quantification models that lead to hesitations regarding the acceptance of these methods for regulatory purposes (Stokes *et al.*, 2011; Schiffelers *et al.*, 2014). Although it has already been shown that induction of Nab by a vaccine is a function of the antigen concentration present in a given vaccine dilution in the NIH test (Diaz *et al.*, 1990), there are doubts whether the mice are suitable models and could predict exactly the vaccine effect in man, or the cell-mediated response. It is also possible that the NIH test has limitations and can not accurately predict the effectiveness of rabies vaccines in humans. This allows us to infer that with this type of test it is not possible to predict vaccine efficacy in humans or in a cell-mediated response, but it is an adequate test to verify the consistency of production by applying trend analysis. The present study aimed to evaluate the lowest Gp1₂ content (determined by D1 ELISA kit – Pasteur Institute, France) capable of inducing a suitable Nab response (> 0.5 IU/ml) in mice, using modified RFFIT adapted for 96-well microplate (mRFFIT).

2. Animals, materials and methods

Tests were carried out in order to assess the serological assay sensitivity and establish the correlation between immunogenicity and viral Gp1₂ content to determine the lower limit of immunogenicity to viral Gp1₂.

2.1. Laboratory animals

Swiss Webster mice (outbred strain), male and female, about 3–4 weeks old, weighing 10–15 g, were obtained from FIOCRUZ / Institute of Biomedical Science and Technology (ICTB - Brazil). Animals were separated by genus, housed in appropriate cages with water and food ad libitum, kept under controlled temperature and humidity (22 ± 1 °C, about 50% relative humidity and 12:12 h photoperiod).

For the NIH test, 48 mice were used per vaccine, 16 animals for each of 3 dilutions and 3 groups of 10 mice for virus titration. For the Serological potency test (SPT), 15 mice were used per vaccine, 5

Table 1
Rabies Vaccine Samples.

Sample	Potency (IU/ dose)	
	INQ6	Potency
Vac 1	19.4	14.4
Vac 2	8.1	4.8
Vac 3	nt	6.8
BR014	9.0	14.9
Vac 5	nt	17.6
Vac 6	nt	4.4
Vac 7	12.3	na

Potency determined by NIH test. nt – not tested. na – not applicable.

animals for each of 3 dilutions, both for the samples and reference vaccine (Moreira *et al.*, 2019). A total of 1289 animals were used in this research in 5 NIH tests and 7 SPT tests. This study was approved by the FIOCRUZ Institutional Animal Care And Use Committee (LW-17/16.).

2.2. Vaccine samples

2.2.1. Test vaccines

Seven batches of rabies vaccine that were approved in potency test in the laboratory routine were selected. Rabies vaccines are presented as freeze-dried with 0.5 mL diluent in one-dose vials. They are produced in Vero cells using the Wistar PM/W38 1503-3M strain of RABV, inactivated by betapropiolactone and purified. The minimum potency required is 2.5 IU/ dose (Table 1).

2.2.2. Reference vaccine

The Brazilian National Rabies Reference Vaccine BR013 (Refvac) is a cell culture vaccine produced in Vero cells, using the RABV PV strain, inactivated by betapropiolactone and lyophilized in multi-dose vials. The lot was manufactured in 2005. The BR013 was certified according to WHO recommendations (WHO, 2006), by the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INQCS), FIOCRUZ, against the 6th International Standard provided by the National Institute of Biological Standards and Control (NIBSC, UK), with the attributed Gp1₂ content of 9.53 IU/mL.

The Pasteur Rabies Reference Vaccine (Pasvac) is provided with D1 ELISA kits – Pasteur Institute (France) with the attributed concentration of 1000 ng/mL of RV Gp1₂.

2.3. NIH test

The NIH test consisted in two ip immunizations (0 and 7 day), with 0.5 mL of the dilutions (Vac 1–3 and 5–7 - 1/25, 1/125 and 1/625) of the test vaccines or Refvac (1/50, 1/250 and 1/1250). The challenge was performed on day 14 by ic route with about 32 LD₅₀/ 0.03 mL of CVS. Simultaneously the challenge virus was titrated. The animals were observed for 14 days and humane endpoints were applied, when they developed signs of rabies. The acceptance criteria adopted were those described in the Brazilian Pharmacopoeia (Brasil, 2010a).

2.4. Serological potency test for rabies vaccines of human use (SPT)

In order to standardize the SPT, for the determination of Nab titers against rabies, sera from vaccinated mice were evaluated by mRFFIT. The vaccination schedule consisted in two ip immunizations (0 and 7 day), with 0.5 mL of the dilutions (Vac 1, 2 and 3 - 1/25, 1/125 and 1/625; Vac 3 - 1/250, 1/1250 and 1/6250; Vac 5 - 1/1100, 1/5500 and 1/27,500; Vac 6 - 1/200, 1/1000 and 1/5000) of the test vaccines or Refvac (1/50, 1/250 and 1/1250). On day 14 after immunization the mice were bled by cardiac puncture under anesthesia. The average volume of blood obtained by animal was about 1.5 mL. The blood

samples were centrifuged after retraction of the clot at 200 g for 15 ± 1 min and sera transferred to sterile cryovials. Sera were inactivated at $56 \pm 1^\circ\text{C}$ for 30 ± 1 min and kept at $-20 \pm 1^\circ\text{C}$ until be tested.

Fifty μl of test sera were serially two-fold diluted from 1/4 to 1/32 and the working virus suspension was diluted to contain 200 focus-forming dose 50% (FFD₅₀). Plates were incubated at $36.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ in a humidified incubator with 5% CO₂ for 90 min. After this time the BHK-21 cell suspension (3.5×10^5 cells/ml) was added and the plates were incubated for 22 h. The plates were washed with PBS, fixed with acetone (80%) and incubated with the commercial rabies nucleocapsid conjugate (Bio-RAD, France) at 37°C for 30 min. After washing and drying, the plates were analyzed under UV microscope to determine the number of positive fields per wells (Brasil, 2010; Moura et al., 2008). Mice sera that completely neutralized the 1/32 dilution were retested in 1/64 to 1/512 dilutions. The Nab titer was calculated using the probit analysis in CombiStats 5.0 (EDQM) and expressed in IU/ml.

The relative potencies of vaccines were determined in SPT by calculation approach that uses the cut-off ≥ 0.5 IU/ml as an indicative of seroconversion titer (Fitzgerald et al., 1978; Wunderli et al., 1991; WHO, 2005; World Organisation for Animal Health - OIE, 2008). The minimum requirement of vaccine potency adopted for the SPT was ≥ 2.5 IU/vial, as in the NIH test. Probit analysis is a type of regression used to analyze binomial response variables. It transforms the sigmoid dose-response curve to a straight line which can be further analyzed by regression either through least squares or through maximum likelihood (Finney, 1971). The SPT protocol was developed and pre-validated, preliminary, as a direct adaptation of NIH test (Moreira et al., 2019).

2.5. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

To evaluate the G1ptn content, the antigen was determined in the vaccine samples by the Laboratory of Analytical Development and Stability from Butantan Institute (São Paulo, Brazil), using the D1 kit from the Pasteur Institute (Paris, France). The G1ptn content was determined by the collaborating laboratory that used its own internal ELISA protocol applying murine D1 monoclonal antibody (mAb-D1) (Jallet et al., 1999) for both plate coating and virus detection (Perrin et al., 1996). The mAb-D1 IgG1 isotype recognizes the antigenic site III (involved in virus Nab induction) of native G1ptn. The vaccines G1ptn content was quantified against two reference standards: Institute Pasteur D1 kit standard (1000 ng/ml) and INCQS BR013 vaccine (9.53 IU/ml) (Pournier-Carvana et al., 2003). The G1ptn concentrations in each of the dilutions were calculated from extrapolations obtained from the total G1ptn determined from undiluted formulations considering the dilution factor.

2.6. Verification of the lower limit of immunogenicity of viral glycoprotein

In order to estimate the lowest antigen concentration inducing adequate immune response (≥ 0.5 IU/ml), serum samples of mice immunized with seven vaccines of known potency and G1ptn content were obtained to achieve minimum antigen levels and to exhaust immune response.

In order to exhaust immune response, three of the vaccine batches were diluted from the ED50 determined at NIH test to get three fivefold serial dilutions (Vac 3, 5 and 6). In Group 1 the vaccine was prepared at the dilution of ED50, in Group 2 it was adjusted to ED50/5 per dose and in the third group diluted ED50/25. Three groups of 10 animals were immunized with two doses (days 0 and 7), ip route with each dilution obtained. In the other four batches (Vac 1, 2, BR014 and 7) the procedures for standardizing the SPT were performed.

After immunizations, blood samples were collected on day 14 and the sera titrated for determination of the Nab titers by mRFFIT. A total of 45 dilutions were tested, yielding 223 (225-2 losses) individual titer results from mice sera and the means were calculated for each dilution

($n = 45$). The mean titers of Nab were expressed in relation to the dilutions nominal G1ptn content in ng/ml and IU/ml. The G1ptn concentration versus responses curves were calculated in logarithm transformed results by simple linear regression. The data were rearranged in increase order of the mean G1ptn titer and verified the starting dilution from which there was induction of adequate immune response.

2.7. Statistical analysis

The results were evaluated by calculating the degree of correlation by simple linear regression and Pearson correlation coefficient in order to determine the degree of association between the data and its significance. The lowest concentration was determined by visual inspection of the results increase reordered as the lowest dilution, expressed in G1ptn concentration in ng/ml and in IU/ml from which a suitable Nab titer was obtained, based on the cutoff adopted. For statistical analysis, Microsoft* Excel, GraphPrism*, MedCalc* and CombiStats* Software were used. When necessary, the potency results were submitted to a logarithmic transformation to improve the normal distribution.

3. Results

The *in vitro* rabies Nab titers of 344 vaccinated mice sera samples were examined by mRFFIT and the potencies were determined in SPT (Table 2).

Table 3 shows the G1ptn content of 7 vaccine lots obtained by Institute Pasteur ELISA-D1 kit. It also includes the G1ptn concentration declared by the producer in the vaccine production protocol and the potency of the vaccines in NIH test and SPT.

In the evaluation of the G1ptn content against the Refvac, compared to the means of Nab titers, there was a seroconversion from 0.0138 IU/ml of G1ptn. After the analysis of the individual Nab titers results, non-responders were identified and these results were removed from the calculation of the means (Vac 1 - one mouse, 1/125, Vac 3 - two mice, 1/1250 and 1/6250). One exception (Vac 4, 1/1250) was detected, where seroconversion (0.90 IU/ml) with a concentration of 0.00277 IU/ml G1ptn occurred (Table 4).

In the G1ptn content determined in ng/ml against the Pasvac, seroconversion occurred from the concentration of 0.388 ng/ml G1ptn. The BR014 (1/1250) also presented seroconversion with a lower content (0.078 ng/ml). The same procedure for the removal of non-responders was adopted in the calculation of the mean values of Nab titers (Table 5).

A linear regression was performed to verify if there was an association between the log values of the Nab titers of the mice obtained by the mRFFIT and the results of the G1ptn content against Refvac (IU/ml). It was observed that the relationship between these two results was significantly correlated ($r = 0.758$; $p < 0.0001$) (Fig. 1A). The log values of the Nab titers mean were also compared by linear regression with the G1ptn content against Pasvac (ng/ml). Once again, the results showed a significant correlation ($r = 0.758$, $p < 0.0001$) (Fig. 1B) (Table 5).

The same procedure was applied to the log values of the mean Nab titers of the BR014. Linear regression demonstrated that the results were correlated with G1ptn content (IU/ml) with the Refvac as standard. The line equation was $Y = 0.4429X + 0.7701$ ($r = 0.913$, $p = 0.2676$) (Fig. 2A). Although the value of r was high, indicating a strong linear correlation of the data, the p -value (> 0.05) showed no statistical significance in the correlation probably due to the small number of data. The linear regression of the Nab titers logarithms of the BR014 against G1ptn content (ng/ml) compared to the Pasvac, also presented the correlated results. The line equation was $Y = 0.3714X + 0.06562$ ($r = 0.921$; $p = 0.2542$) (Fig. 2B). Although the value of r was high too, showing a strong linear correlation of the data, the p -value (> 0.05) indicated that there was no statistical significance in the

Table 2
Dilution of rabies vaccines, glycoprotein content against Refvac (IU/ml) and Pasvac (ng/ml) by ELISA and means of neutralizing antibody titers (IU/ml) by mRFFIT in the SPT.

Sample	Dilution	ELISA		SPT	ELISA		SPT	ELISA		SPT	ELISA		SPT
		IU/ml	ng/ml	Nab IU/ml	IU/ml	ng/ml	Nab IU/ml	IU/ml	ng/ml	Nab IU/ml	IU/ml	ng/ml	Nab IU/ml
BR014	1/50	0.06929	1.958	0.87	0.06929	1.958	1.03	0.06929	1.958	1.00	0.06929	1.958	1.47
	1/250	0.01386	0.392	1.67	0.01386	0.392	0.57	0.01386	0.392	1.00	0.01386	0.392	1.03
Vac 1	1/1250	0.00277	0.078	0.07	0.00277	0.078	0.25	0.00277	0.078	0.09	0.00277	0.078	0.90
	1/25	0.18246	4.060	0.80	0.18246	4.060	0.81						
Vac 2	1/125	0.03649	0.812	0.55*	0.03649	0.812	0.64						
	1/625	0.00730	0.162	0.28	0.00730	0.162	0.20						
Vac 3	1/25	0.20318	4.257	0.89									
	1/125	0.04064	0.851	0.86									
Vac 4	1/625	0.00813	0.170	0.28									
	1/25	0.26499	3.880	2.06									
Vac 5	1/125	0.05300	0.776	0.74									
	1/625	0.01060	0.155	0.28									
Vac 6	1/250	0.02650	0.388	1.36	0.02650	0.388	1.11						
	1/1250	0.00530	0.078	0.25	0.00530	0.078	0.25						
Vac 7	1/6250	0.00106	0.016	0.24**	0.00106	0.016	0.29**						
	1/1100	0.00300	0.060	0.19	0.00300	0.060	0.25						
Vac 8	1/5000	0.00060	0.016	0.11	0.00060	0.016	0.12						
	1/27500	0.00012	0.003	0.15	0.00012	0.003	0.26						
Vac 9	1/200	0.03377	0.662	1.18	0.03377	0.662	1.63						
	1/1000	0.00675	0.132	0.20	0.00675	0.132	0.18						
Vac 10	1/5000	0.00135	0.026	0.35	0.00135	0.026	0.12						

Nab mean after removal *one and **two animals.

Table 3
Rabies vaccines Glycoprotein content and potency in the NH and serological tests.

Sample	Glyc		Potency (IU/dose)		
	(ng/ml) ¹	(IU/ml) ²	NH	SPT ³	
Vac 1	101.50	4.56	6.6	19.44	6.39
Vac 2	106.43	5.08	6.6	8.13	6.62
Vac 3	96.99	6.62	7.4	6.8 [†]	9.46
BR014	97.91	3.46	4.0	9.0	nd
Vac 5	88.07	3.30	8.2	17.6 [†]	nd
Vac 6	132.38	6.75	8.8	4.4 [†]	nd
Vac 7	107.08	4.45	na	12.3	nd

¹ Glycoprotein content determined by ELISA applying murine D1 antibody for plate coating and virus detection against the Pasvac (1000 ng/ml) and.

² Refvac (9.53 IU/ml).

³ Glyc declared by the producer.

⁴ Determination of relative potency by SPT.

[†] Potency determined by the producer. nd - not done, na - not applicable.

correlation may be due to the small number of data.

After this verification, it was established that the minimum concentration of Glyc capable of inducing a satisfactory immune response (≥ 0.5 IU/ml) for the vaccines of this study, and to guarantee efficacy, was 0.0138 IU/ml or 0.388 ng/ml.

Intra- and inter-assay variances of the Nab titers logarithms were calculated by dilution. So, it was obtained the intra-assay gCV% of 31.99 (SPT 01/17) and 31.65 (SPT 02/17) and inter-assays gCV% of 31.82%.

4. Discussion

For better understand of the sensitivity of serological assays based on viral neutralization revealed in cell culture, the study for determining the lower limit of immunogenicity to Glyc was carried out. In this study it was calculated the correlation between the Glyc content, measured by ELISA-D1 kit and the titer of Nab, assessed by mRFFIT.

The seven batches of vaccines used in this study contained different

Table 4
Rabies vaccines Glycoprotein content (IU/ml) against Refvac and means of neutralizing antibody titers of mice.

Sample	Glyc ¹		Nab ²		Glyc	Nab
	(ng/ml)	(IU/ml)	(IU/ml)	(IU/ml)		
BR014	101.50	4.56	6.6	19.44	6.39	6.39
	106.43	5.08	6.6	8.13	6.62	6.62
Vac 1	96.99	6.62	7.4	6.8 [†]	9.46	9.46
	97.91	3.46	4.0	9.0	nd	nd
Vac 2	88.07	3.30	8.2	17.6 [†]	nd	nd
	132.38	6.75	8.8	4.4 [†]	nd	nd
Vac 3	107.08	4.45	na	12.3	nd	nd
	101.50	4.56	6.6	19.44	6.39	6.39
Vac 4	106.43	5.08	6.6	8.13	6.62	6.62
	96.99	6.62	7.4	6.8 [†]	9.46	9.46
Vac 5	97.91	3.46	4.0	9.0	nd	nd
	88.07	3.30	8.2	17.6 [†]	nd	nd
Vac 6	132.38	6.75	8.8	4.4 [†]	nd	nd
	107.08	4.45	na	12.3	nd	nd

¹ Glycoprotein content (IU/ml) determined by ELISA-D1 against Refvac.

² Means of Nab titers (IU/ml) determined in mRFFIT per vaccine dilution. Hatched cells indicate seroconversion ≥ 0.5 IU/ml.

[†] Nab mean after removal of two animals.

** Mean after removal one mouse, n = 45.

Glyc concentrations, ranging from 3.3 to 6.75 IU/ml or 88.07 to 132.38 ng/ml. The mean of the Nab titers were paired with the Glyc content, the concentration of effective seroconversion (0.0138 IU/ml, 0.388 ng/ml of Glyc) was identified, and the results were directly correlated by linear regression.

The correlation coefficients between Glyc content and Nab titers mean were considered suitable ($r = 0.758$), higher than that observed by other research groups that found a weak correlation (Smith et al., 2013). The same was observed for BR014 which the results were also correlated ($r = 0.913$ and 0.921). These data showed a positive and strong correlation between the antibody response and the antigen amount in the vaccine such as revealed in the study about furunculosis vaccines in Atlantic salmon, whose find Pearson's Correlation of $r = 0.82$ (Romstad et al., 2013). The same results of positive correlation between the antibody response of H9N2 inactivated vaccine formulas in

Table 5
Glycoprotein content of rabies vaccines (ng/ml) against Pasvac and means of neutralizing antibody titers of mice.

Glptn ¹	Nab ²	Glptn	Nab	Glptn	Nab
0.003	0.15	0.090	0.19	0.662	1.18
0.003	0.26	0.090	0.25	0.662	1.63
0.016	0.24	0.016	0.20	0.776	0.74
0.016	0.29	0.003	0.18	0.812	0.55
0.016	0.11	0.135	0.28	0.812	0.64
0.016	0.12	0.162	0.28	0.851	0.86
0.003	0.35	0.162	0.20	1.058	0.87
0.001	0.12	0.170	0.28	1.058	1.03
0.078	0.25	0.388	1.36	1.058	1.00
0.078	0.25	0.388	1.11	1.058	1.47
0.078	0.07	0.392	1.67	1.058	2.03
0.078	0.25	0.392	0.57	3.880	2.06
0.078	0.09	0.392	1.00	4.060	0.80
0.078	0.90	0.392	1.03	4.060	0.81
0.078	0.23	0.392	1.26	4.257	0.89

¹ Glycoprotein content (ng/ml) determined by ELISA-D1 against Pasvac.
² Means of Nab titers (IU/ml) by mRFFIT per vaccine dilution. Crosshatched cells indicate seroconversion ≥ 0.5 IU/ml.
 * Nab mean after removal of two animals.
 ** Mean after removal one mouse. n = 45.

both commercial broilers and specific-pathogen-free (SPF)-chickens were also reported (Kilany et al., 2016). The serological response of SPF-chickens was measured after immunization with inactivated Newcastle disease vaccines and the content of the vaccines was highly correlated with the antibody titers ($r = 0.87$ and 0.97), similar to our findings (Maas et al., 2003). In a clinical trial involving adult volunteers where anti-rabies vaccines were tested (Ferguson and Schild, 1982), and in another study with cattle (Schumacher et al., 1989; Piza et al., 2002), antibody responses showed a correlation between the antigenic content of the vaccine and the Nab titer similar to that observed in mice in our experiments.

In the study of Romstad et al. (2013), there is also a dose correlation between the antibody response and protection against challenge. This is another similarity to our study because we believe that low titers of Nab would not protect the animals from an ic challenge as previously described (Fitzgerald et al., 1978; Wunderli et al., 1991), and here we observe that lower antigen content worse the seroconversion is.

Classically, the efficacy of immunobiological products for rabies is demonstrated by methods that use ic challenge as indicative of a adequate immune response (Brazil, 2010a; Council of Europe, 2013; Council of Europe, 2015). Studies have shown that the survival rate of NIH is correlated with Nab titers in mice (Fitzgerald et al., 1978; Wunderli et al., 1991). Therefore, the Nab titer ≥ 0.5 IU/ml was adopted as the minimum dose conferring protection in mice. Since a correlation was found between the Nab titer and the Glptn content, it can be inferred that the serological assay described here may be a candidate to replace the NIH. Nevertheless, an approach using ic

challenge and the assessment of the Glptn lower limit of immunogenicity, combined with the serologic evaluation, could be useful in the search for improvements in SPT for the purpose of future replacement of NIH.

Future validation studies should include potent, sub-potent, and borderline samples classified by the NIH to assess the sensitivity of the SPT and to verify if the method is able to distinguish between regular and sub-potent batches of vaccines. In this way it will be possible to evaluate the methodology and propose improvements for the test.

An advantage of the SPT is directly measuring the Nab titer and vaccine immunogenicity. This fact may be convenient in the search for a replacement of the NIH test. The mRFFIT was as effective as NIH test in estimating the ability of a vaccine batch to induce protection against RABV infection, as recognized by other researchers (Gibert et al., 2013). This same hypothesis also has already been raised previously using other assays to assess immunogenicity by quantifying Glptn (Smith et al., 2013). But we agree that, as other authors claim, in vitro methods measure binding antibodies, whereas in vivo tests, such as mRFFIT, measure Nab and directly reveal humoral immunity, being safer.

Today, ELISA and simple radial immunodiffusion are recommended to determine antigen content in the formulation of human vaccine batches, but the NIH test is maintained in the potency assessment (WHO, 2007; Council of Europe, 2015). However, it has been demonstrated that induction of Nab by a vaccine is a function of the concentration of antigen present in a given vaccine dilution in NIH test (Diaz et al., 1990), as noted here. This allows to infer that this type of test is adequate to verify the consistency of production being indicative of the efficacy of the vaccine (WHO, 2007; Council of Europe, 2013). In addition to the considerable reduction of the animal's number, combining this approach with GMP and other quality systems, together with the statistical analysis at each stage of the production process, serological assays in the consistency approach can be applied in batch release. Thus, it will be possible to obtain quality and reduce the in vivo tests on finished products as indicated in other similar studies (Kreftenberg, 2002; Arciniega and Sirota, 2012).

The rabies vaccine is the only pharmaceutical product in which the minimum dose has not been defined, or as already pointed out by other research (Dodet, 2011), how much active component should be injected into the patient. This becomes a problem for the control of the vaccine schemes and for the evaluation of patient's seroconversion. WHO recommends the same potency (2.5 IU) for all cell culture vaccines, and these can be applied by intra-muscular or intradermal routes, but dose volumes are fixed although the vaccine batch potency. For this reason, the results presented here may also contribute in this field.

In conclusion, the lowest Glptn content determined by ELISA capable of inducing a suitable Nab response in mice was found. Positive, significant and linear correlation was found between the Glptn content and Nab titer demonstrating the potential of serological assay mRFFIT-based for checking the compliance of the vaccine lots to specifications and being a candidate for future research and validation. Considerable refinement and reduction in animal use are expected, and the method

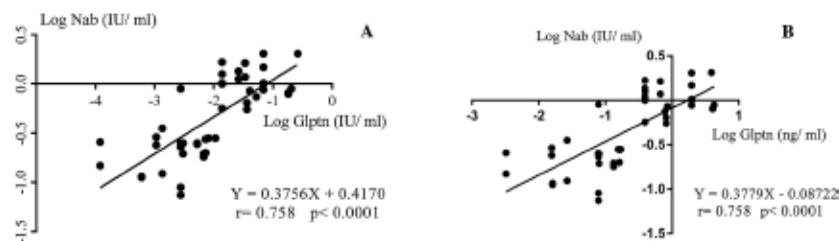


Fig. 1. (A) Linear regression of the Nab titers logarithms of mice (Log Nab) against the Glptn content (Log Glptn) of rabies vaccine batches against Ref.vac. (B) Linear regression of the Nab titers logarithms of mice versus the Glptn content (Log Glptn) of rabies vaccine batches against the Pasvac.

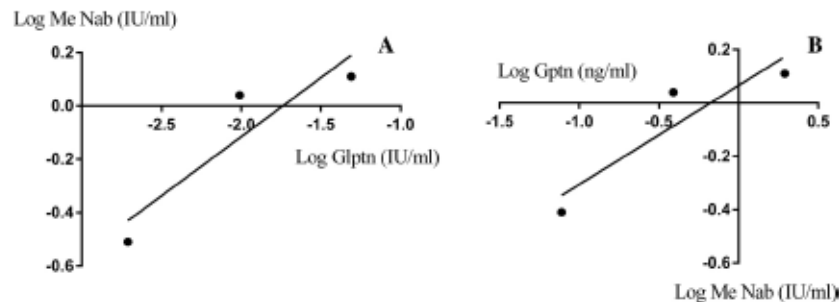


Fig. 2. (A) Linear regression of the Nab mean titers logarithms (Log Me Nab) against the Giptn content (Log Giptn) of rabies vaccine batches against Refvac. (B) Linear regression of the Nab titers logarithms (Log Me Nab) of mice immunized with BR014 and the Giptn content (Log Giptn) of rabies vaccine batches against Pasvac expressed in ng/ml.

can be used to control the quality of inactivated human rabies vaccines in official control laboratories and by manufacturers. The SPT is rapid, efficient and in accordance with the immunogenicity induced in mice, and therefore may be recommended for validation as a potency test to replace the NH test.

Conflict of interest

There is no conflict of interest of the authors of this paper.

Acknowledgements

We are grateful to Instituto Butantan for providing the CVS sample and performing the Giptn content determination; Dr. Edson Roberto Alves de Oliveira for english revision; to CAPES and to the Post-Graduation Program in Sanitary Surveillance of the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCCQ/IOC/CRUZ - Brazil). This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

- Arciniegas, J., Simón, L.A., 2012. Potential application of the consistency approach for vaccine potency testing. *Dev. Biol. (Basel)* 134, 135–139.
- Arlin, R.J., Wiktor, T.J., Sikes, R.K., 1973. The antibody-binding test for vaccine potency. In: Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*, 3rd ed. World Health Organization, Geneva, pp. 265–267.
- Bennassar, A., Leblond, P., Coulon, P., Yefferson, C., Gaudin, Y., Flemand, A., Lafay, F., 1991. Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *J. Virol.* 65, 4198–4203.
- Brasil, 1988. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria no 228, de 25 de outubro de. Instruções for the Control of the Production and Marketing of Vaccines and Anti-rabies Serum for veterinary use. Instruções referentes ao Controle da Produção e Comercialização de Vacinas e Soro Anti-rábico para uso veterinário. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 31 out. 1988. Available from: <http://www.senar.gov.br/silegit/action/detailsAto.do?metodo=detalharAtoAvoroktipo=FOR&numeroAto=00000228&seqAto=000&valorAto=1988&orgao=MAP&codTipo=Adulturn=A&doctumFim=#> [accessed 03 February 2016].
- Brasil, 2010a. 5^a ed. Farmacopéia Brasileira. [Inactivated Rabies Vaccine]. Vacina Raiva Inativada, vol. 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, pp. 1366–1368.
- Brasil, 2010b. 5^a ed. Farmacopéia Brasileira. [Anti-rabies serum]. Soro antirrábico. Farmacopéia Brasileira, vol. 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, pp. 1297–1298.
- Bruckner, L., Casler, K., Halder, M., Barar, J., Castle, P., Duchow, K., et al., 2003. Three R approaches in the quality control of inactivated rabies vaccines. *Alim. Lab. Antm.* 31, 429–454.
- Chabaud-Roux, M., Mormo, N., Guinchard, F., Nicolé, M.C., Niogret-Gibson, E., Seve, N., et al., 2017. G-protein based ELISA as a potency test for rabies vaccines. *Biologicals* 46, 124–129.
- Council of Europe, 2013. The European Pharmacopoeia. Rabies Vaccine (Inactivated) for Veterinary Use, 8.0 ed. Council of Europe, European Department for the Quality of Medicines within the Council of Europe, Strasbourg, pp. 1008–1011.
- Council of Europe, 2015. The European Pharmacopoeia. Rabies Vaccine for Human Use Prepared in Cell Culture, 8.2 ed. Council of Europe, European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, Strasbourg, pp. 3953–3954.
- Diaz, A.M.O., Miller, R.A., Cortés, M.A., Dolleppan, N., Ellegren, D., Filipe, F., et al., 1990. Rabies adjuvanted vaccine for use as a regional standard for Latin America and the Caribbean countries. *Biologicals* 18, 288–297.
- Dietzschold, B., Gove, M., Marchand, D., Nis, H.S., Banatvala, H.S., Orvos, I., et al., 1990. Structural and immunological characterization of a linear virus neutralizing epitope of the rabies virus glycoprotein and its possible use in a synthetic vaccine. *J. Virol.* 64, 3804–3809.
- Dotot, B., 2011. Antigen content versus volume of rabies vaccines administered intradermally. *Biologicals* 39, 444–445. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.08.002>.
- Ferguson, M., 1996. Single radial immunodiffusion test for the determination of the glycoprotein content of inactivated rabies vaccines. In: Meslin, F.-X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*, 4th edition. WHO, Geneva, pp. 378–382.
- Ferguson, M., Schild, G.C., 1982. A single-radial-immunodiffusion technique for the assay of rabies glycoprotein antigen: application to potency tests of vaccines against rabies. *J. Gen. Virol.* 59 (1), 197–201.
- Finney, D.J., 1971. *Probit Analysis*, 3rd ed. Cambridge University Press, New York.
- Hitzgerald, E.A., Gallagher, M., Hunter, W.S., Seligman Jr, E.R., 1978. Use of the antibody assay in immunized mice for the determination of rabies vaccine potency. *Develop Biol Standard* 40, 183–186.
- Formier-Caracas, J., Poitier, B., Haand, G., Jallet, C., Puchs, F., Tordo, N., Perdre, P., 2003. Inactivated rabies vaccine control and release: use of an ELISA method. *Biol* 31, 9–16.
- Garnob, K., Senda, M., Itoh, O., Muramatsu, M., Hirasawa, N., Kozai, R., et al., 1996. Use of ELISA for in vitro potency test of rabies vaccines for animal use. *Biologicals* 24, 95–101.
- Gilbert, R., Albert, M., Poitier, B., Jallet, C., Tordo, N., Morgaux, S., 2013. A relevant in vitro ELISA test in alternative to the in vivo NH test for human rabies vaccine batch release. *Vaccine* 31, 8022–8029.
- Habel, K., 1966. *Handbook for potency. Laboratory Techniques in Rabies. Monography Series World Health Organization*, vol. 23. WHO, pp. 140–143.
- ICTV 9th Report, 2011. [Internet]. International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV [cited 2017 Sep 01]. Available from: <http://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv-9th-report/negative-sense-mx-viruses-2011/w/negative-sense/2011/rhabdoviridae>.
- Jallet, C., Jacob, V., Bahkoul, C., Deings, A., Deaménilles, E., Tordo, N., Perdre, P., 1999. Chimeric lyssavirus glycoproteins with increased immunological potential. *J. Virol.* 73, 225–233.
- Kilany, W.H., Ali, A., Buzid, A.-H.I., El-Deeb, A.H., El-Abidin, M.A.Z., El Sayed, M., El-Kady, M.F., 2016. A Dose-Response Study of Inactivated Low Pathogenic Avian Influenza H9N2 Virus in Specific-Pathogen-Free and Commercial Broiler Chickens. *Wildl. H. Avian Dis.* 60, 256–261. <https://doi.org/10.1637/11143-050815-Reg>.
- Krimer, B., Schildberger, H., Behnkehof-Nicol, H.A., Henschmann, K.M., Duchow, K., 2000. The rapid fluorescent focus inhibition test is a suitable method for batch potency testing of inactivated rabies vaccines. *Biologicals* 37, 119–126.
- Krimer, B., Bruckner, L., Dase, A., Milos, C., 2010. Cell based study for validation of a serological potency assay for rabies vaccine (inactivated) for veterinary use. *Pharmazie Biol Sci News* 2, 39–55.
- Kroshenberg, J.G., 2002. Consistency testing of diphtheria and tetanus to replace potency testing for lot release. *Dev. Biol. (Basel)* 111, 298–298.
- Ino, T.R., Mizusawa, N., Hishida, M., Yamamoto, K., Fujita, T., Hings, S., et al., 1998. Antigenic and functional analysis of glycoprotein of rabies virus using monoclonal antibodies. *Microbiol. Immunol.* 42, 187–193.
- Mao, R.A., Kozman, M., van Diepen, M., Ooi, H.L., UTM, Classroom, 2003. Correlation of haemagglutinin-neuraminidase and fusion protein content with protective antibody response after immunisation with inactivated Newcastle disease vaccine. *Vaccine* 21, 3137–3142. [https://doi.org/10.1016/S0264-4103\(03\)00249-4](https://doi.org/10.1016/S0264-4103(03)00249-4).
- Mattos, C.A., Mattos, C.C., Ruppelch, C.E., 2001. *Rhabdovirus*. In: Krüger, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds.),

- Field's Virology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1245–1278.
- Moreira, W.C., Freitas, J.F.S., Machado, N.S., AEOC, Almeida, Moura, W.C., 2019. Development and pre-validation of a quantitative multi-dose serological assay for potency testing of inactivated rabies vaccines for human use. *Journal of Virological Methods* January 263, 54–59.
- Morgaux, S., Poidier, B., Ragen, C.I., Wilkinson, D., Amblin, U., Guinet-Morlet, F., et al., 2017. Replacement of *in vivo* human rabies vaccine potency testing by *in vitro* glycoprotein quantification using ELISA – results of an international collaborative study. *Vaccine* 35, 996–9971.
- Moura, W.C., Gallina, N.M., Furlan, R.M., Roesija, P.C., Leite, J.P., 2008. Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study. *J. Virol. Methods* 54, 7–13.
- Nagasajan, T., Reddy, G.S., Mohana, S.B., Rajalalohani, S., Thiagarajan, D., Tordo, N., et al., 2006. A simple immunocapture ELISA to estimate rabies viral glycoprotein antigen in vaccine manufacture. *Biologicals* 34, 21–27.
- Perrin, P., Lafon, M., Sureau, P., 1996. Enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA) for the determination of glycoprotein content of rabies vaccines. In: Meslin, F.-X., Kaplan, M.-M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*, 4th ed. WHO, pp. 383–388.
- Perrin, P., Morgaux, S., Sureau, P., 1990. *In vitro* rabies vaccine potency appraisal by ELISA: advantages of the immunocapture method with a neutralizing anti-glycoprotein monoclonal antibody. *Biologicals* 18, 328–330.
- Piza, A.T., Pined, K.M.S., Lima, G.M., Caporali, G.M.M., Boreman, M.T., Machado, L.A., Zanoni, C.R., 2002. Effect of the contents and form of rabies glycoprotein on the potency of rabies vaccination in cattle. *Mem Inst Oswaldo Cruz* March 97 (2), 265–268.
- Rozental, A.R., Beltrán, L.J., Middylng, P., Gravingstad, K., Esmena, Ø., 2013. Antibody responses correlate with antigen dose and *in vivo* protection for cell-adjuvanted, experimental francisella (*Aeromonas salmonicida* subsp. salmonicida) vaccine in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and can be used for batch potency testing of vaccines. *Vaccine* 31, 791–796. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.069>.
- Roojshakar, E.J., Green, J., Iltisotogus, J., van Horwijzen, J., Osterhaus, A., 1996. Development and evaluation of alternative testing methods for the *in vivo* NIH potency test used for the quality control of inactivated rabies vaccines. *Dev. Biol. Stand.* 86, 137–145.
- Ruppel, C.R., Kuzmina, I., Meslin, F., 2017. Lysaviruses and rabies: current controversies, concerns, contradictions and controversies. *P1000 Res* 6 (February), 184. <https://doi.org/10.12688/11000res06.10416.1>.
- Schiffman, M.J., Blashower, B., Bulker, W., Hinkelson, C., 2014. Replacing the NIH test for rabies vaccine potency testing: a synopsis of drivers and barriers. *Biologicals* 42, 205–217. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2014.04.001>.
- Schumacher, C.L., Distenfeld, B., Erd, H.C., Niu, H.S., Ruppel, C.R., Koprowski, H., 1989. Use of mouse anti-rabies monoclonal antibodies in postexposure treatment of rabies. *J. Clin. Invest.* 84, 971–975.
- Seligman, J.E., 1966. Potency-test requirements of the United States national institute of health (NIH). *Laboratory Techniques in Rabies*, 2nd ed. WHO, Geneva, pp. 145.
- Smith, T.G., Ellison, J.A., Ma, X., Kuzmina, N., Carson, W.C., Ruppel, C.R., 2013. An electrochemiluminescence assay for analysis of rabies virus glycoprotein content in rabies vaccines. *Vaccine* 31, 3333–3338.
- Stokes, W., Kalpa-Eddy, J., McFadland, R., 2011. Introduction and summary of the international workshop on alternative methods to reduce, refine, and replace the use of animals in vaccine potency and safety testing: state of the science and future directions. *Proc Vaccines* 5, 1–15.
- Stokes, W., McFadland, R., Kalpa-Eddy, J., Greenwood, D., Lewis, R., Haldor, M., et al., 2012. Report on the international workshop on alternative methods for human and veterinary rabies vaccine testing: state of the science and planning the way forward. *Biologicals* 40, 369–381.
- Wilbur, L.A., Ashbert, M.F.A., 1996. The NIH test for potency. In: Meslin, F.-X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*, 4th ed. WHO, Geneva, pp. 360–368.
- World Organization for Animal Health - OIE, 2008. *OIE Terrestrial Manual 2.1.13 Rabies*. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Publications/268/Documentations/doc/pdf/20113_RABIES.pdf.
- World Health Organization, 2009. *Recommendations for Inactivated Rabies Vaccine for Human Use Produced in Cell Substrates and Embryonated Eggs*. WHO Technical Report Series, no. 941. Geneva. [accessed in 2018 Jun 10]. Available from: pp. 100–110. http://www.who.int/biologicals/publications/whosetoc/vaccines/sabies/Annex06_20090209inactivatrabiesvaccine.pdf?ua=1.
- World Health Organization, 2006. *Recommendations for the Preparation, Characterization and Establishment of International and Other Biological Reference Standards*. WHO Technical Report Series, No. 932. Geneva.
- World Health Organization, 2005. *WHO expert consultation on rabies, final report*. Geneva, Switzerland. Report No.: TRS 931.
- Wunderli, P.S., Shaddock, J.H., Schmid, D.S., et al., 1998. The protective role of humoral neutralizing antibody in the NIH potency test for rabies vaccines. *Vaccine* 9, 638–642.