

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

Nathalia de Souza Machado

**IMPACTO DA REDUÇÃO DO NÚMERO DE CAMUNDONGOS NO ENSAIO DE
POTÊNCIA NIH PARA AVALIAÇÃO DAS VACINAS CONTRA RAIVA DE USO
HUMANO**

Rio de Janeiro

2019

Nathalia de Souza Machado

**IMPACTO DA REDUÇÃO DO NÚMERO DE CAMUNDONGOS NO ENSAIO DE
POTÊNCIA NIH PARA AVALIAÇÃO DAS VACINAS CONTRA RAIVA DE USO
HUMANO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico 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 Mestre em Ciências.

Orientador: Antônio Eugênio C. C. de Almeida

Orientador: Wlamir C. de Moura

Rio de Janeiro

2019

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Machado, Nathalia de Souza

Impacto da redução do número de camundongos no ensaio de potência NIH para avaliação das vacinas contra raiva de uso humano. / Nathalia de Souza Machado. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019.

72 f. : fig. ; graf. ; tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

Orientador: Antônio Eugênio Castro Cardoso de Almeida.

Co-orientador: Wlamir Corrêa de Moura.

1. Raiva. 2. Vacinas. 3. Potência. I. Título.

Impact of reducing the number of mice on the NIH potency assay for the evaluation of human rabies vaccines.

Nathalia de Souza Machado

**IMPACTO DA REDUÇÃO DO NÚMERO DE CAMUNDONGOS NO ENSAIO DE
POTÊNCIA NIH PARA AVALIAÇÃO DAS VACINAS CONTRA RAIVA DE USO
HUMANO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico 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 Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutora)
Fundação Oswaldo Cruz

Marcelo Salabert Gonzalez (Doutor)
Universidade Federal Fluminense

Márcia Cristina Ribeiro Andrade (Doutora)
Fundação Oswaldo Cruz

ORIENTADORES

Antônio Eugênio Castro Cardoso de Almeida (Doutor)
Fundação Oswaldo Cruz

Wlamir Corrêa de Moura (Doutor)
Fundação Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho a minha mãe Sandra Davies e aos meus avós Maria da Glória Davies e Leopoldo Lustosa que sempre me incentivaram e ampararam em todos e quaisquer momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que superei e alcancei em minha vida.

A minha mãe Sandra, minha avó Glorinha, meu avô Leopoldo, meu irmão João Paulo e meu tio Sandro por todo amor, ajuda e apoio em todos os momentos, nunca me deixando desistir e sempre me incentivando.

Ao meu orientador, um grande exemplo e amigo, Dr. Wlamir Corrêa de Moura, pela confiança, pelo incentivo, paciência e dedicação na colaboração e execução de todos os projetos até chegarmos à dissertação final.

Ao Dr. Antônio Eugênio Castro Cardoso de Almeida pela orientação.

Ao grande amigo Dr. Wildeberg Cál Moreira pela orientação, ajuda, ensinamentos e pelo exemplo a ser seguido.

A equipe do Laboratório de Vacinas Virais – Raiva: Sr^a. Ivani Cutis dos Santos, Sr^o. Dejaildo Marques da Silva e a amiga Jéssica F.S. Freitas pela amizade, companheirismo e auxílio nos experimentos e no dia a dia.

À Dr.^a Maria Helena Simões Villas Bôas pela preciosa revisão.

Ao amigo Marlon Akio da Silva Issobe pela amizade, companheirismo e auxílio desde os anos do curso de residência até atualmente no mestrado.

Àqueles que mesmo distantes se mostraram tão especiais, acreditando em meu projeto inicial, em meu potencial e dedicação: Clayton Gitti, Luiz Ricardo Berbert, Vinicius Zahal, Sabrina Alberti, Danielle Vigo e Deyse Ribeiro.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, pela oportunidade em cursar o Mestrado e pela qualidade do ensino fornecido.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação, deixo o meu Muito Obrigada!

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não
sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não
sou o que era antes.

Marthin Luther King

RESUMO

A raiva é uma antropozoonose viral infecciosa, altamente letal, transmitida por mamíferos e caracterizada como uma encefalite aguda progressiva. A OMS estima que cause 59.000 mortes humanas, anualmente no mundo. No Brasil ocorreram 41 casos da doença de 2008 a 2018. A prevenção consiste na aplicação de vacinas, em pessoas expostas ao contato com o vírus. As vacinas modernas de cultivo celular são altamente eficazes na prevenção da doença, mas necessitam de rigoroso controle da qualidade antes do uso. O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) é responsável pela liberação de lotes de imunobiológicos. A determinação da potência das vacinas é o controle mais crítico, como indicador de consistência de produção. A potência é avaliada pelo teste de desafio em camundongos que utiliza um grande número de animais e lhes causa dor e sofrimento. Com o avanço da consciência ética, bem-estar animal e necessidade da substituição dos modelos utilizados na pesquisa, busca-se o desenvolvimento de métodos alternativos que demonstrem a consistência de produção destas vacinas. O ensaio de potência NIH apresenta uma série de problemas inerentes aos ensaios em animais e há um movimento internacional na busca por aplicação dos 3Rs, como ensaios modificados com redução do número de animais e ensaios sorológicos, assim como uma substituição total por um método imunoenzimático. O presente trabalho avaliou impactos da redução do número de camundongos utilizado nos ensaios para o controle da qualidade das vacinas antirrábicas de uso humano de 16 para oito animais por diluição de vacina. Uma análise retrospectiva de dados comparou os dados obtidos com 251 amostras de vacina testadas no ensaio padrão (EP), utilizando 16 animais por diluição, com os resultados obtidos apenas com as primeiras gaiolas – grupo G1 e considerando as segundas gaiolas como uma replicata desta – grupo G2, ambas com oito animais apenas por diluição. A relevância do ensaio reduzido foi avaliada comparando os resultados do EP com os resultados obtidos por G1 e G2 utilizando: o índice kappa, o gráfico de Bland-Altman, o Coeficiente de Concordância de Correlação e parâmetros sensibilidade e especificidade. A confiabilidade do ensaio foi avaliada pelo CV% e limites de confiança, enquanto o impacto da redução foi avaliado pela análise no intervalo de confiança das potências e nos parâmetros regressão, linearidade e paralelismo. Os resultados obtidos indicam que as modificações do ensaio padrão NIH reduzido para oito camundongos por diluição é

viável para ser aplicado nos ensaios rotineiros de potência, com informações estatísticas completas sobre a validade de cada determinação de potência individual, e que pode reduzir em 50% o número de animais utilizados nas vacinas teste.

Palavras-chave: Raiva. Vacinas. Potência. 3Rs. EPNIH.

ABSTRACT

Rabies is a highly lethal, infectious viral anthroponosis transmitted by mammals and characterized as a progressive acute encephalitis. The WHO estimates it causes 59,000 human deaths annually worldwide. In Brazil 41 cases of the disease occurred from 2008 to 2018. Prevention consists of the application of vaccines to people exposed to contact with the virus. Modern cell culture vaccines are highly effective in disease prevention, but require strict quality control prior to use. The National Institute of Quality Control in Health (INCQS) is responsible for the release of immunobiological lots. The determination of vaccine potency is the most critical control, as an indicator of production consistency. The potency is evaluated by the challenge test in mice that uses a large number of animals and causes them pain and suffering. With the advances in ethical awareness, animal welfare and the need to replace the models used in the research, we look for the development of alternative methods that demonstrate the consistency of production of these vaccines. The NIH potency assay presents a number of problems inherent in animal testing and there is an international movement in the pursuit of 3Rs, such as modified assays with reduced numbers of animals and serological assays, as well as total replacement by an ELISA assay. The present study evaluated the impact of reduction of the number of mice used in the tests for quality control of rabies vaccines for human use from 16 to 8 animals per vaccine dilution. A retrospective data analysis compared the data obtained with 251 vaccine samples tested in the standard test- EP, using 16 mice per dilution, with the results obtained using only with the first cages - group G1, of each dilution and considering the second cages of each dilution as a replicate of this group - G2 , both with 8 mice only per cage. The relevance of the reduced assay was evaluated by comparing the results of the ST with the results obtained by G1 and G2 using: the kappa index, the Bland-Altman plot, the CCC and sensitivity and specificity parameters. The reliability of the assay was evaluated by CV% and confidence limits, while the impact of the reduction was evaluated by the potency confidence interval analysis and the regression, linearity and parallelism parameters. The results indicate that the reduced NIH assay using only eight mice per dilution is feasible for routine potency assays with complete statistical information on the validity of each individual potency determination and can reduce the number of animals used in the vaccines test in 50%.

Keywords: Rabies. Vaccines. Potency. 3Rs. NIHPT.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa mundial demonstrando países com presença e ausência de raiva humana transmitida por cães	17
Figura 2 - Mapa mundial com a distribuição global da raiva transmitida por cães (A: mortes humanas por raiva; B: taxa de mortalidade per capita (por 100.000 habitantes)	17
Figura 3 - Estrutura do vírus rábico	19
Figura 4 - Patogenia da raiva humana	21
Gráfico 1 - Número total de casos de raiva humana no Brasil/ano de 2008 a 2018	22
Gráfico 2 - Distribuição dos casos de raiva humana nas regiões geopolíticas do Brasil de 1990 a 2018	22
Gráfico 3 - Número de casos de raiva humana / espécie transmissora de 2008 a 2018	23
Figura 5 – Esquema de distribuição do número de camundongos utilizados no EPNIH seguindo recomendações da Ph. Brasil 2014 ou 2010	39
Figura 6 – Gráfico de Bland-Altman - gráficos de dispersão da diferença entre as potências em relação à média das potências	48
Figura 7 – Comparação do efeito da redução do número de camundongos por diluição no EPNIH no intervalo de confiança 95% nos três grupos	54
Figura 8 – Efeito da redução do número de camundongos por diluição no EPNIH no intervalo de confiança 95% em cada grupo	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aplicação do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov nos grupos EP, G1 e G2	46
Tabela 2 – Teste de Wilcoxon dos pares de dados	47
Tabela 3 – Coeficiente de variação (CV%) intra amostra e intra ensaio	48
Tabela 4 – Avaliação dos gráficos de Bland-Altman pela abordagem de identidade	49
Tabela 5 – Coeficiente de concordância de correlação entre os grupos reduzidos e o ensaio padrão	49
Tabela 6 – Categorização dos resultados como “Aprovado” ou “Reprovado”, por grupo, com base na potência mínima requerida	50
Tabela 7 – Tabela de contingência para o cálculo do índice de Kappa de Fleiss entre os grupos EP/G1 (Tab. 7a) e EP/G2 (Tab. 7b)	51
Tabela 8 - Resultados discordantes, expressos em UI/dose e categorizados como “Aprovado” ou “Reprovado” nos grupos EP, G1 e G2 e no reteste (média)	52
Tabela 9 – Avaliação do limite de confiança 95%	55
Tabela 10 – Comparação do número de amostras reprovadas pelo IC em relação as aprovadas ao avaliar o limite inferior de confiança de potência .	55
Tabela 11 – Valores para linearidade e paralelismos dos grupos EP, G1 e G2	56
Tabela 12 - Avaliação dos critérios estatísticos de aceitação de ensaios regressão, paralelismo e linearidade dos 62 ensaios utilizados no estudo, nos grupos EP, G1 e G2	59
Tabela 13 – Avaliação dos parâmetros sensibilidade e especificidade dos ensaios reduzidos G1 e G2	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i>
BraCVAM	Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CCC	Coeficiente de Concordância de Correlação
CCLs	Cérebro de camundongos lactentes
CEME	Central de Medicamentos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Concea	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CV	Coeficiente de Variação
CVS	<i>Challenge Virus Standard</i>
DE	Dose Efetiva
DL50	Dose Letal 50%
DP	Desvio Padrão
e.g.	<i>Exempli Gratia</i>
EP	Ensaio padrão
EPNIH	Ensaio de Potência <i>National Institute of Health</i>
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramma
G1	Gaiola 1
G2	Gaiola 2
HDCV	Vacina de Células Diploides Humanas
i.c.	Intracerebral
IC	Intervalo de Confiança
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
ID	Intradérmica
i.p.	Intraperitoneal
Ig	Imunoglobulina
IM	Intramuscular
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
JNM	Junções Neuromusculares
LCCDMA	Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitro
MS	Ministério da Saúde
nAChR	Receptores Nicotínicos de Acetilcolina
nm	Nanómetro
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PCECV	Vacinas Purificadas de Embrião de Galinha
PEP	Profilaxia Pós-Exposição
Ph. Bras.	Farmacopeia Brasileira
Ph. Eur.	<i>The European Pharmacopoeia</i>
PNI	Programa Nacional de Imunizações
PNPR	Programa Nacional de Profilaxia da Raiva
PVCV	Vacinas Purificadas de Células Vero
RABV	Rabies vírus
RIFFT	Teste de Rápida Inibição de Focos Fluorescentes
RN	Resolução Normativa
RNA	Ácido Ribonucleico
SAL	Serviço de Animais de Laboratório
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SNPS	Sistema Nervoso Parassimpático
TECPAR	Instituto de Tecnologia do Paraná
UI	Unidade Internacional
UNESCO	Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura
VERO	Célula de Rim de Macaco Verde Africano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Vírus rábico	18
1.2 Patogenia	20
1.3 Raiva humana no Brasil	21
1.4 Profilaxia antirrábica	23
1.5 Vacinas contra raiva de uso humano	25
1.6 Controle da qualidade de imunobiológicos contra raiva no Brasil	28
1.7 Determinação da potência da vacina antirrábica	29
1.8 Métodos alternativos ao uso de animais de laboratório	30
1.9 Justificativa	33
2 OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo geral	36
2.2 Objetivos específicos	36
3 METODOLOGIA	37
3.1 Animais de laboratório	37
3.2 Ensaio de potência <i>National Institute of Health (EPNIH)</i>	38
3.3 Vacinas	40
3.4 Estudo retrospectivo	40
3.5 Análise estatística dos dados	41
3.5.1 Precisão de medição	42
3.5.2 Coeficiente de concordância de correlação de Lin (CCC).....	42
3.5.3 Índice Kappa de Fleiss	43
3.5.4 Intervalos de confiança	43
3.5.5 Regressão, linearidade e paralelismo	44
3.5.6 Sensibilidade e especificidade	45
4 RESULTADOS	46
4.1 Análise exploratória dos dados - teste de Kolmogorov-Smirnov	46
4.1.1 Comparação dos resultados de potência – teste de Wilcoxon	46
4.2 Efeitos da redução do número de animais no EPNIH – relevância e confiabilidade	47

4.2.1 Coeficiente de variação	47
4.2.2 Gráfico de Bland-Altman	48
4.3 Coeficiente de concordância de correlação de Lin	49
4.4 Índice Kappa de Fleiss	50
4.4.1 Concordância de resultados	50
4.4.2 Simulação de reteste para resultados contraditórios	52
4.5 Efeitos nos intervalos de confiança	53
4.5.1 Intervalo de confiança de 95%	53
4.5.2 Requisito mínimo para limite inferior de confiança de potência	55
4.6 Regressão, linearidade e paralelismo	56
4.7 Sensibilidade e especificidade	59
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65

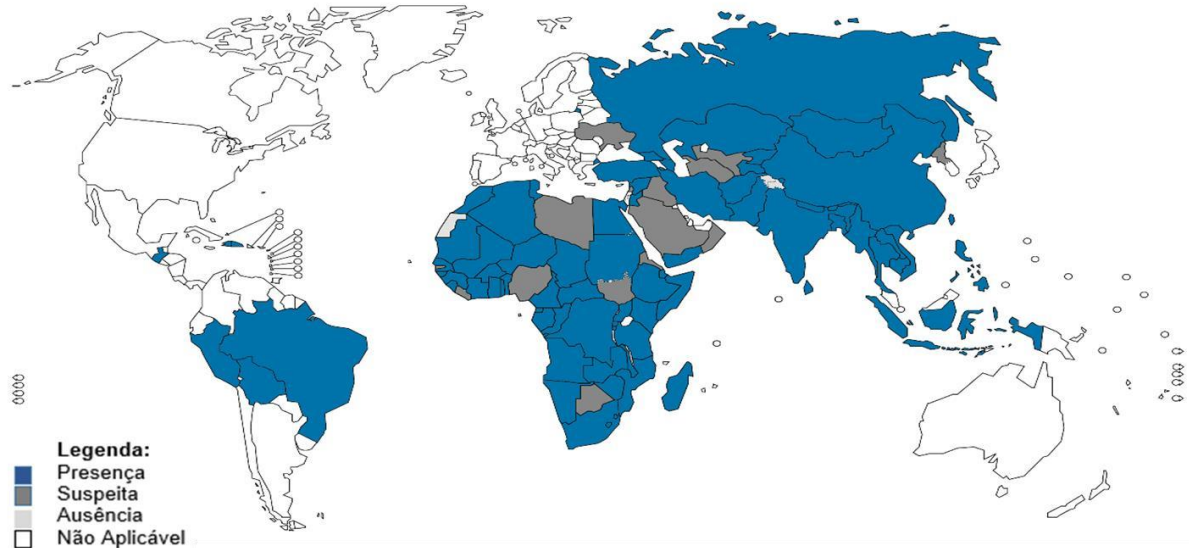
1 INTRODUÇÃO

A Raiva (*rabhas*, Sânscrito: cometer violência) é uma antropozoonose, de etiologia viral, caracterizada por uma encefalomielite aguda. É uma doença de distribuição global, encontrada em mais de 150 países e territórios, em quase todos os continentes, exceto na Antártida (WHO, 2019). Acomete todos os mamíferos, sendo transmitida ao homem pela inoculação do vírus presente na saliva do animal infectado, principalmente pela mordedura de cães e, mais raramente, pela arranhadura e lambadura de mucosas e/ou pele lesada (BRASIL, 2008a).

Apesar de ser uma doença conhecida desde a antiguidade, continua representando um grande problema de saúde pública, devido ao seu alto grau de letalidade e ao alto custo na assistência preventiva dos possivelmente expostos ao contato com o vírus. Uma vez iniciada a sintomatologia, a doença é quase invariavelmente fatal (BRASIL, 2008a; BRASIL, 2011a). A Organização Mundial da Saúde (OMS) relata que mais de 99% das transmissões da raiva são mediadas pelos cães domésticos e que metade da população mundial, que vive em áreas endêmicas de raiva canina, encontra-se sob risco de contrair a doença (WHO, 2016). A Figura 1 representa a distribuição da raiva humana, transmitida por cães, no mundo no período de 2010 a 2014.

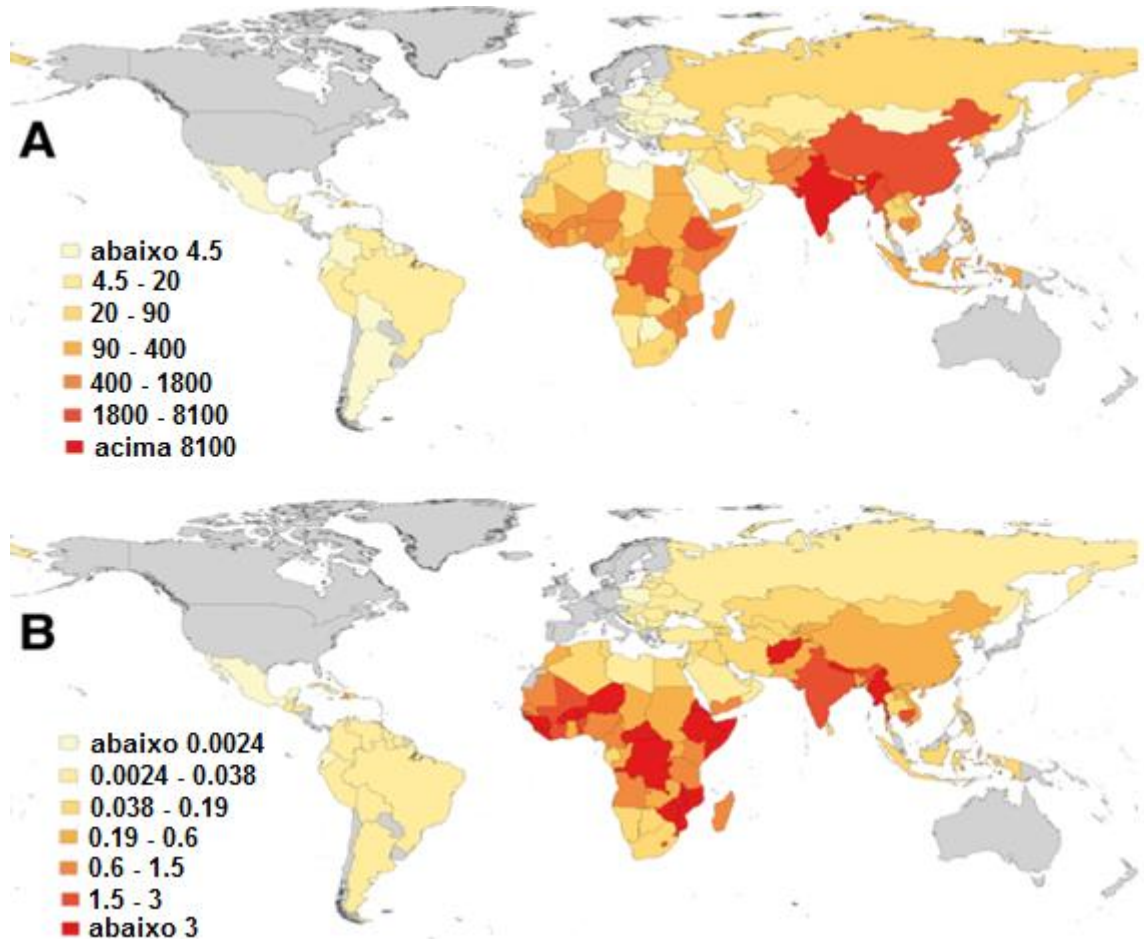
A OMS estima que haja 59.000 mortes humanas, anualmente no mundo, decorrentes da raiva, em mais de 150 países, a maioria de crianças menores de 15 anos, principalmente nas regiões rurais da África e da Ásia, onde a conscientização e o acesso à profilaxia pós-exposição apropriada são limitados ou inexistentes (WHO, 2019). A Figura 2 representa a distribuição global da raiva transmitida por cães, sendo as áreas em cinza aquelas livres de raiva canina (WHO, 2019).

Figura 1 - Mapa mundial demonstrando países com presença e ausência de raiva humana transmitida por cães.



Fonte: (Adaptado Organização Mundial da Saúde WHO, 2014).

Figura 2 - Mapa mundial com a distribuição global da raiva transmitida por cães (A: mortes humanas por raiva; B: taxa de mortalidade per capita (por 100.000 habitantes)).



Fonte: (Adaptado Organização Mundial da Saúde WHO, 2019).

Com base na Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), foram registrados 2.298 casos humanos nas Américas (1990 a 2018) (OPAS, 2019). Diante de tal situação, mais de 15 milhões de pessoas recebem profilaxia pós-exposição (PEP) todos os anos (OIE, 2016; WHO, 2017).

Quando as novas vacinas produzidas em cultivo celular são utilizadas apropriadamente, podem prover 100% de proteção com alto grau de segurança (DRESSEN, 1997). Em casos de exposição grave, a imunização ativa concomitante com o uso de Imunoglobulinas G (IgG) é recomendada pela OMS (WHO, 2017).

Com isso, é de suma importância que as vacinas distribuídas pelo Ministério da Saúde (MS), à rede de saúde, sejam capazes de agir com eficácia nos protocolos de imunização, ao ativar adequadamente, no sistema imune, a produção de anticorpos. Sendo assim, se faz necessário um rigoroso controle da qualidade das vacinas antirrábicas, principalmente no ensaio de potência, considerado o principal teste do controle da qualidade, pois está diretamente ligado à eficácia do produto (CABASSO, 1991). Seguindo as recomendações da OMS (WHO, 2007), a Farmacopeia Brasileira (Ph. Bras.), em sua 5ª edição, recomenda a utilização do ensaio de potência *National Institute of Health* (EPNIH), um teste de desafio em camundongos, para a potência da vacina antirrábica (BRASIL, 2010).

Atualmente, a busca pela substituição do uso de modelos animais em pesquisas científicas é uma meta de relevância internacional, sendo necessários estudos extensos para o desenvolvimento de métodos alternativos que venham a substituir, reduzir ou pelo menos, refinar metodologias hoje empregadas para a avaliação da potência das vacinas e que forneçam resultados confiáveis (METZ et al., 2002).

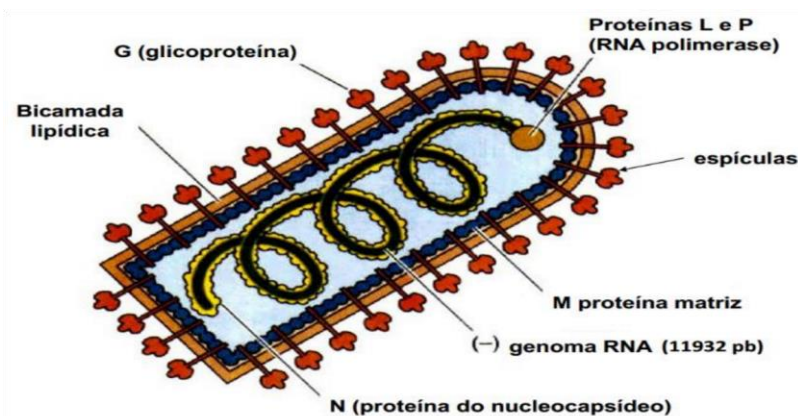
1.1 Vírus rábico

O vírus da raiva é neurotrópico, ou seja, possui afinidade pelo Sistema Nervoso (SN). É classificado como pertencente à ordem dos Mononegavirales, da família Rhabdoviridae e gênero Lyssavirus, possuindo como espécie clássica da raiva o Rabies vírus (RABV). Assim como os vírus pertencentes a esta família, possui ácido ribonucleico (RNA) de fita simples, linear, não segmentado de polaridade negativa (WUNNER, 1991, TORDO, 1996, WUNNER et al., 2013).

Morfologicamente, é um vírus de formato rígido e aspecto semelhante a um projétil de revólver. Possui comprimento médio de 180 nm e diâmetro médio de 75 nm (WUNNER, 1991, ACHA et al., 2003, WUNNER et al., 2013).

É constituído por um ribonucleocapsídeo de simetria helicoidal envolto por um envelope, de natureza lipídica, de onde emergem espículas de glicoproteína. Possui 5 genes, cada qual codificando uma proteína viral estrutural (Figura 3). O RNA e as proteínas N (nucleoproteína), L (polimerase), P (fosfoproteína) formam a fita helicoidal do ribonucleocapsídeo, enquanto que a glicoproteína (G) e a proteína matriz (M) formam o envelope viral (BRASIL, 2008a).

Figura 3 - Estrutura do vírus rábico.



Fonte: (Adaptado de FERNANDES, 2015).

As duas proteínas principais são a glicoproteína (G) de superfície, responsável pela adsorção do vírus na célula do hospedeiro e pela formação de anticorpos vírus neutralizantes e a nucleoproteína (N), que é interna e grupo específico que encapsula o RNA viral (ACHA et al., 2003; BRASIL, 2011a).

A proteína L é a responsável pela síntese de RNA, a P pela transcrição, replicação e transporte axoplasmático e a proteína M interliga o envelope ao nucleocapsídeo (BRASIL, 2008a).

O vírus da raiva é sensível aos solventes orgânicos (detergente, éter, formol, clorofórmio e acetona), etanol a 45-70%, preparados iodados, compostos de amônia quaternária, hipoclorito de sódio (água sanitária) 2% ou 5%. É sensível às temperaturas de pasteurização, à luz ultravioleta e inativado a 60°C em 35 segundos. Possui resistência à dessecação, assim como a congelamentos e descongelamentos sucessivos, se mantém ativo a 4°C por alguns dias e a -70°C ou liofilizado (4°C)

durante anos e apresenta relativa estabilidade a pH entre 5-10 (KAPLAN, 1996; MATTOS; MATTOS; RUPPRECHT, 2001; BRASIL, 2008a; KOTAIT et al., 2009).

1.2 Patogenia

O vírus rábico é inoculado, principalmente, por meio da mordedura do animal infectado. O vírus penetra na pele, replica-se nos miócitos do músculo estriado ou nas células do tecido subepitelial, realizando uma baixa replicação (já que o vírus possui tropismo pelo Sistema Nervoso Central - SNC) no sítio de inoculação até atingir concentrações suficientes para alcançar as terminações nervosas. Em maiores concentrações, o vírus liga-se, por meio de suas glicoproteínas, a receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) das junções neuromusculares (JNM). As partículas do vírus nas células musculares, brotam pela fenda sináptica das JNM, onde alcançam as terminações nervosas, por meio de sinapses especializadas entre os terminais nervosos eferentes e as fibras musculares e disseminam-se via centrípeta para o SNC (Figura 4). Esse período de replicação extra neural é o responsável pelo período de incubação da doença, que é extremamente variável, dependendo da concentração viral inoculada e proximidade da lesão com regiões inervadas (DAVIS et al., 2015; FERNANDES, 2015).

O vírus migra via Sistema Nervoso Periférico (SNP), por transporte axonal retrógrado, percorrendo a medula espinhal até o SNC onde realizará uma replicação maciça, principalmente no hipocampo, tronco cerebral e nas células de Purkinje no cerebelo (BRASIL, 2008a).

Após sua infecção e intensa replicação no SNC, representada por uma encefalomielite, inicia-se uma disseminação centrífuga, via Sistema Nervoso Parassimpático (SNPS), em direção a vários órgãos extra neurais, incluindo as glândulas salivares, córnea, pulmões, coração, rins, bexiga, útero, testículos e folículo piloso (Figura 4). Momento esse essencial para o início da transmissão do vírus que passa a ser eliminado pela saliva dos animais e pessoas infectadas (BRASIL, 2008a; DAVIS et al., 2015; FERNANDES, 2015).

Figura 4 – Patogenia da raiva humana.

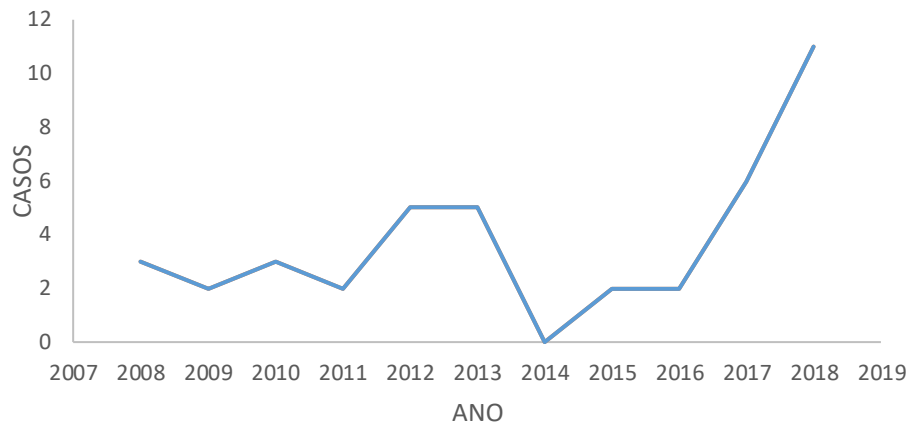


Fonte: (Adaptado de TEIXEIRA, 2019).

1.3 Raiva humana no Brasil

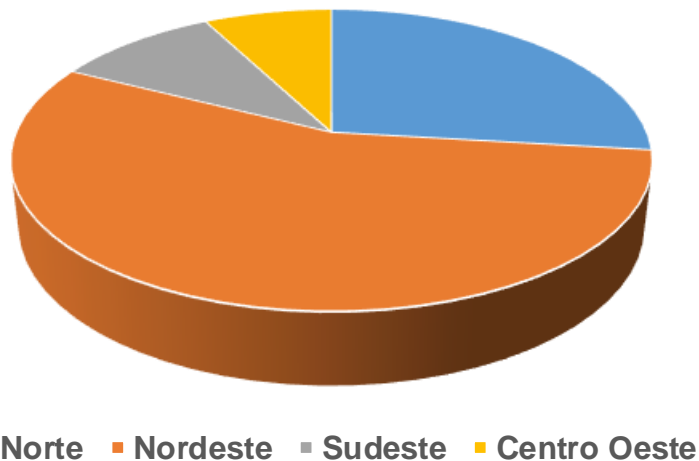
A raiva é uma zoonose conhecida desde a Antiguidade, sendo a luta contra a doença antiga. Apesar de ser uma das primeiras doenças humanas a possuir uma vacina experimentalmente desenvolvida utilizada com sucesso em 1885 e das autoridades de saúde pública se esforçarem, com sucesso, para reduzir a incidência de raiva humana transmitida por cães em todas as regiões brasileiras, a raiva ainda é considerada uma doença endêmica no país, principalmente com o crescimento de casos transmitidos por morcegos (BRASIL, 2017a). Desde 1990 a 2018 foram registrados 610 casos humanos, sendo nos últimos 10 anos (2008 a 2018) registrados 41 casos (Gráfico 1), com uma média de 4 casos/ano. A região Nordeste apresenta uma maior fragilidade a surtos ou casos de raiva humana (Gráfico 2), apresentando 48,78% dos casos no país, enquanto que na região Sul, desde 1987 não existem relatos da doença (BRASIL, 2017a, BRASIL, 2019).

Gráfico 1 - Número total de casos de raiva humana no Brasil/ano de 2008 a 2018.



Fonte: (Do autor baseado em BRASIL, 2017a; BRASIL, 2019).

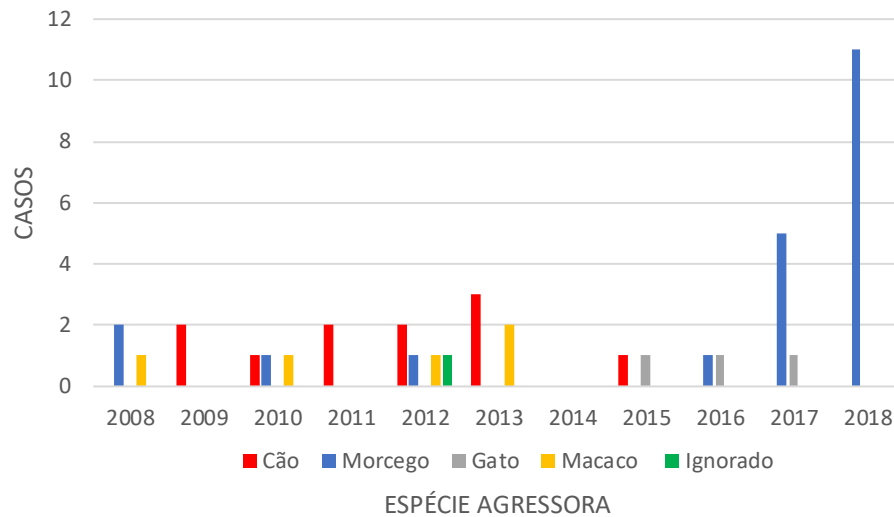
Gráfico 2 - Distribuição dos casos de raiva humana nas regiões geopolíticas do Brasil de 1990 a 2018.



Fonte: (Do autor baseado em BRASIL, 2017a; BRASIL, 2019).

No país, os cães e morcegos são os principais transmissores da doença aos humanos, sendo eles os responsáveis por 32 casos no período compreendido de 2008 a 2018 (Gráfico 3), representando 78,05% do total dos casos (BRASIL, 2017a). Apesar do cão ser considerado o principal transmissor da doença ao homem, há algum tempo, tem sido observado um aumento nos casos de raiva transmitida por morcegos (BRASIL, 2011a; MORIKAWA et al., 2012).

Gráfico 3 - Número de casos de raiva humana / espécie transmissora de 2008 a 2018.



Fonte: (Do autor baseado em BRASIL, 2017a, BRASIL, 2019).

No Estado do Rio de Janeiro, o último caso registrado da doença em humanos, ocorreu no final de 2006, na zona rural de São José do Vale do Rio Preto (Região Serrana), tendo como espécie transmissora o morcego hematófago (BRASIL, 2017a; OPAS, 2019). Em relação a transmissão por cães, o último caso ocorreu em 1985, no entanto, o vírus continua circulando no Município do Rio de Janeiro. O laboratório do Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman recebeu 135 morcegos não hematófagos para o diagnóstico da raiva, no período de 2001 a 2010, sendo 11 (8,14 %) positivos para a doença (CABRAL et al., 2012).

A endemia de raiva gera um alto custo em assistência médica (CALDAS, 2015) e apesar do *status* de controle da doença, este aumento se deve a mudanças em fatores como o tipo de relação homem/cão e ao próprio crescimento das populações humana e canina.

1.4 Profilaxia antirrábica

O tratamento para uma exposição à raiva possui custo médio de US\$ 40 na África e US\$ 49 na Ásia, representando um fardo econômico catastrófico para as famílias afetadas, cuja renda média diária é de cerca de US\$ 1 – 2 por pessoa. Todos os anos, mais de 15 milhões de pessoas em todo o mundo recebem uma vacinação pós exposição. Isto é capaz de evitar centenas de milhares de mortes por raiva anualmente (OIE, 2017).

Estima-se que o custo econômico total da raiva transmitida por cães seja de US\$ 8,6 bilhões. Os principais custos associados à raiva transmitida por cães variam por região, mas incluem perdas na produtividade devido a morte prematura, custo da PEP e custos diretos para o setor médico e vítimas de agressão (WHO, 2019).

No Brasil, a endemia gera um alto custo em assistência médica. Segundo informações do Gerente da Unidade Técnica de Vigilância de Zoonoses, Dr. Eduardo Caldas, no período de 2009 a 2013 houve uma média de 592 mil atendimentos ao ano para profilaxia da raiva. De 2013 a 2018, foram gastos aproximadamente R\$ 80 milhões ao ano (CALDAS, 2015; ROCHA, 2019).

A profilaxia pós-exposição consiste na aplicação da vacina antirrábica naquela população susceptível a exposição permanente a infecção pelo vírus rábico, seja em atividades ocupacionais que representem alto risco (como em laboratórios que manipulam o vírus da raiva ou em atividades profissionais que levam contato direto com morcegos, carnívoros ou outros mamíferos que possam estar infectados), seja naqueles que irão viajar para áreas não controladas ou afetadas pela raiva (BRASIL, 2011a; OIE, 2017).

O esquema vacinal consiste na aplicação de 3 doses da vacina nos dias 0, 7 e 28, podendo ser realizada por via intramuscular (IM) profunda (no músculo deltoide ou vasto lateral da coxa), utilizando a dose completa (0,5 mL) ou via intradérmica (ID) na dose de 0,1 mL na inserção do músculo deltoide (BRASIL, 2011a). Vale ressaltar que não é recomendável a aplicação IM no glúteo, pois resulta em uma menor resposta expressa como título de anticorpos (ACHA et al., 2003). A aplicação ID é pouco usual, mesmo que recomendada pela OMS pois reduziria os custos com o programa de vacinação, já que utiliza-se volumes menores da vacina. No Brasil, o uso desta via foi normatizado com a publicação da Nota Informativa nº 26 – SEI/2017 que passou a ser utilizada em unidades que apresentem os pré-requisitos para tanto. Esta norma também alterou o esquema de vacinação de 5 doses para 4 doses para pós-exposição, quando a vacina de cultivo celular é utilizada (BRASIL, 2017b).

Para que haja uma correta avaliação do esquema vacinal, a partir do 14º dia após finalização do mesmo, é necessária a realização do controle sorológico com o intuito de averiguar se o organismo respondeu adequadamente na produção de anticorpos. Títulos maiores que 0,5 UI/mL são considerados indicadores de resposta, porém se esses títulos são menores, deve-se realizar uma dose de reforço IM e uma nova sorologia após 14 dias dessa aplicação. A periodicidade da realização da

sorologia, para titulação de anticorpos dos profissionais que realizam a profilaxia pré-exposição irá variar conforme o risco a que são expostos (BRASIL, 2011a).

A PEP consiste no tratamento imediato da ferida e da imunização passiva e/ou ativa do indivíduo agredido ou exposto, com o intuito de evitar a entrada do vírus no SNC, o que culminaria em morte (OIE, 2017; Brasil, 2011a). O ferimento deve ser lavado cuidadosamente, o mais rápido possível, com água corrente e sabão na tentativa de eliminar ou inativar o vírus e assim diminuir riscos de infecção. Recomenda-se a utilização de antissépticos como álcool-iodado, iodopovidona, digluconato de clorexidina, compostos de amônio quaternário 1%, tintura de iodo e álcool 40-70% (ACHA et al., 2003; COLLIER et al., 2000).

Para uma adequada escolha da profilaxia aplicada pós-exposição, deve-se realizar uma acurada e completa anamnese. Para tal deve-se avaliar o tipo de exposição com base nas características da lesão (local, profundidade, extensão, número de lesões), severidade do acidente (leves ou graves), espécie animal agressora (cães, gatos, animais silvestres, animais de baixo risco) e condição do animal agressor (suspeito ou não de raiva). Assim sendo, o indivíduo exposto poderá ser submetido apenas a limpeza do ferimento e/ou vacinação (esquema de até 4 doses IM ou ID) e/ou aplicação de soro (BRASIL, 2011a; BRASIL, 2017b).

A raiva é uma doença evitável pelo uso da vacina. Segundo a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), a vacinação de cães é a estratégia mais eficiente para prevenção da Raiva humana, já que, reduz o número de mortes atribuíveis à raiva e a necessidade de PEP como parte do tratamento de pacientes mordidos por cães (OIE, 2017).

1.5 Vacinas contra raiva de uso humano

As vacinas são medicamentos imunobiológicos que contêm uma ou mais substâncias antigênicas que, quando inoculadas, são capazes de induzir imunidade específica ativa, a fim de proteger contra, reduzir a severidade ou combater doença causada pelo agente infeccioso que originou o antígeno (BRASIL, 2010). A vacina antirrábica é indicada nos casos em que deseja-se uma resposta imune ativa com a produção de anticorpos vírus-neutralizantes contra raiva (COUNCIL OF EUROPE, 2003).

Em 1880, o cientista francês Louis Pasteur e seus colaboradores, dentre os quais, Émile Roux, Charles Chamberland e Louis Thuillier, iniciaram estudos sobre a raiva e no ano seguinte conseguiram isolar o vírus. A partir do isolamento viral, realizaram sucessivas passagens virais no SNC de coelhos e submeteram a medula espinhal desses animais ao dessecamento e ação da potassa, tornando o vírus mais “estável”, com virulência e período de incubação constantes, podendo ser utilizado em laboratório para a produção de vacinas. Seus estudos trouxeram grandes avanços, principalmente com o desenvolvimento da vacina antirrábica, a qual foi utilizada com sucesso em 1885 para o tratamento de Joseph Meister, menino que fora agredido por um cão raivoso e pelo jovem Jean-Baptiste Berger Jupille, que lutou com um cão raivoso para salvar crianças. Tal acontecimento proporcionou grande repercussão, já que se obteve êxito no tratamento de uma doença letal e temida, fazendo com que Pasteur alertasse sobre a necessidade de criação de uma instituição de pesquisa, para produção e aplicação da vacina (KOTAIT et al., 2009).

Diante disso, em fevereiro de 1888, meses antes da inauguração do Instituto Pasteur de Paris, Dom Pedro II fundara o Instituto Pasteur do Rio de Janeiro, ambos criados com o propósito de difundir a vacina contra raiva (BENCHIMOL, 1999). Em 1903, foi fundado o Instituto Pasteur em São Paulo, como instituição de caráter privado, com objetivos científicos e humanitários (INSTITUTO PASTEUR DE SÃO PAULO, 2016).

Como a raiva urbana permanecia endêmica no Brasil por muito tempo, em 1973, ano de criação do Programa Nacional de Imunizações (PNI), foi também criado o Programa Nacional de Profilaxia da Raiva (PNPR), mediante convênio firmado entre os MS, Ministério da Agricultura (atual Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA), Central de Medicamentos (CEME) e a OPAS com o objetivo de reduzir o número de casos de raiva humana pela aplicação de medidas sistemáticas de controle da doença nos animais domésticos e profilaxia nas pessoas expostas ao risco de contrair a doença (SCHENEIDER et al., 1996).

Apesar de introduzida no Brasil em 1965, a vacina Fuenzalida (FUENZALIDA; PALÁCIOS, 1955), somente foi escolhida, dentre as várias vacinas até então produzidas no Brasil, no ano de 1973 como a que melhor atenderia às exigências do PNPR, sendo produzida, a partir daí, com a adoção da inativação pela beta-propiolactona e adotando testes e padrões para o controle da qualidade de sua produção (SILVA et al., 1967; MARKUS et al., 1971). Apesar de toda discussão a

respeito de efeitos colaterais causados por tal classe de vacina, esta foi utilizada em grande escala em humanos até 2003 e em cães e gatos até o início da década de 2010, permitindo que a raiva fosse controlada com êxito na maior parte do país (MOURA, 2009).

A partir do ano de 2000, o estado de São Paulo iniciou a utilização da vacina purificada produzida em células Vero de uso humano (VERORAB, Aventis Pasteur, França). Os demais estados continuaram utilizando a vacina produzida em cérebro de camundongos lactentes fabricada pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) até 2003. Neste ano 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 Sanofi Pasteur (na época, Aventis Pasteur), produtora francesa da vacina (MOURA, 2009).

A vacina consiste em uma suspensão inativada, preparada a partir de vírus rábico (cepa Wistar PM/WI38 1503-3M), replicado em cultura de células Vero, as quais foram adaptadas para cultivo em grande escala sobre microcarreadores. Após o crescimento na cultura de células, os vírus são concentrados, inativados pela betapropiolactona, purificados por ultracentrifugação e estabilizados com albumina humana, maltose e a vacina submetida à liofilização. A vacina é distribuída sob a forma liofilizada junto a um diluente estéril e com potência mínima de 2,5 UI/dose (BRASIL, 2010; SANOFI PASTEUR, 2013).

Quando as novas vacinas produzidas em cultivo celular, como as de Células Diplóides Humanas (HDCV), as Purificadas de Células Vero (PVCV) e as Purificadas de Embrião de Galinha (PCECV), são utilizadas apropriadamente, podem prover 100% de proteção com alto grau de segurança, independentemente da linhagem celular utilizada (DRESSEN, 1997).

O requerimento de potência para as vacinas produzidas em cultivo celular, descrito na Ph. Bras., é de 2,5 UI/dose (BRASIL, 2010). A dose é de 0,5 mL para a vacina em células Vero tanto para o regime pré-exposição quanto para o pós-exposição quando utilizada pela via IM e 0,1 mL quando utilizada pela via ID (BRASIL, 2017b). As vacinas contra raiva induzem uma resposta imune ativa que inclui a produção de anticorpos vírus-neutralizantes. A produção de anticorpos leva aproximadamente de 7 a 10 dias para ocorrer e os anticorpos neutralizantes detectáveis contra o vírus rábico podem persistir por vários anos (VODOPIJA; CLARK, 1991).

1.6 Controle da qualidade de imunobiológicos contra raiva no Brasil

Os imunobiológicos são produtos elaborados por ou derivados de organismos vivos. Incluem uma variedade de produtos, como as vacinas, imunoglobulinas, anticorpos monoclonais e policlonais (antisoros) e biofármacos (COUNCIL OF EUROPE, 2003).

Os primeiros imunobiológicos não eram submetidos a nenhum controle da qualidade e como resultado as vacinas, às vezes, continham vírus insuficientemente inativado, eram contaminadas com outros patógenos ou possuíam potência insuficiente (MOURA, 2009).

No Brasil, em maio de 1981, foi observada a necessidade de garantir a qualidade dos produtos empregados no PNI, de maneira mais rigorosa e efetiva, em virtude da contaminação da vacina contra poliomielite importada da Iugoslávia. Diante disso, observou-se a necessidade de reformular o Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos (LCCDMA), que se encontrava impossibilitado de exercer o controle adequado sobre a qualidade dos produtos, devido à falta de recursos humanos e matérias. Frente a isso, uma nova sede foi criada e em 1983 o laboratório iniciou suas atividades como Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) (BRASIL, 2013).

Atualmente, o controle da qualidade das vacinas é realizado pelo laboratório produtor e deve obedecer a critérios preconizados pela OMS. Após testados pelo produtor, cada lote é submetido a análise no INCQS antes de ser distribuído a rede pública de saúde.

O INCQS é o Laboratório Nacional de Controle responsável pelo controle da qualidade dos imunobiológicos no Brasil, desde a sua fundação. Esse controle é realizado lote a lote, baseado em normas oficiais, análises documentais dos protocolos de produção e de ensaios laboratoriais. Tais análises possuem como propósito verificar os requisitos mínimos exigidos nas normas oficiais garantindo que cada lote apresente a mesma consistência de lotes que demonstraram eficácia. Somente depois de demonstrada sua consistência de produção, são liberados para uso.

Dentre os ensaios biológicos preconizados para o controle de vacinas inativadas contra raiva e soros antirrábicos, o mais importante é o ensaio de potência

(CABASSO, 1991). Do ponto de vista de um regulador, o teste de potência é importante para fornecer informações confiáveis sobre o desempenho do lote de vacina (KAMPHUIS et al., 2011).

1.7 Determinação da potência da vacina antirrábica

Dentre os ensaios biológicos preconizados para o controle das vacinas contra raiva inativadas e dos soros antirrábicos, os mais importantes são os ensaios de potência. A potência é tipicamente considerada como "a capacidade de um produto produzir uma atividade biológica esperada" (SCHROCK, 2012). O *International Conference on Harmonization* (ICH, 1999) define potência como "... a medida quantitativa de atividade baseada no atributo do produto que é ligado às propriedades biológicas relevantes...".

Não existe um sistema de animais de laboratório ideal para demonstrar a eficácia das vacinas contra raiva administradas após a exposição. Na ausência deste sistema, testes laboratoriais baseados em imunização pré-exposição de camundongos vêm sendo utilizados para a determinação da potência da vacina antirrábica humana (VODOPIJA; CLARK, 1991).

O EPNIH desenvolvido no *National Institute of Health* dos Estados Unidos da América (EUA) (SELIGMANN, 1966), é recomendado pela OMS para controle da qualidade de vacinas de uso humano utilizadas na prevenção da raiva. Esta técnica exige a utilização de uma vacina de referência para calcular de forma relativa a potência das vacinas em teste e de um lote de vírus trabalho da cepa *Challenge Virus Standard* (CVS) com título padronizado (WHO, 1992).

Desde 1987, o INCQS avalia a potência das vacinas antirrábicas inativadas de uso humano pelo EPNIH. O ensaio consiste em submeter diferentes grupos de camundongos a duas imunizações, com intervalos de sete dias entre elas, com diluições crescentes da vacina teste e da vacina de referência. Os camundongos são desafiados 14 dias após a primeira imunização, com uma mesma dose contendo de 10 a 50 doses letais 50% (DL50) (e.g 32 DL50) de vírus padrão de desafio (CVS) por via intracerebral (i.c.). Após 14 dias do desafio, determina-se a dose efetiva (DE) capaz de proteger 50% dos camundongos vacinados e a partir desta é possível calcular a potência relativa (DE50 de uma vacina teste dividida pela DE50 de uma vacina de

referência). O requerimento mínimo de potência é de 2,5 UI/dose (WILBUR; AUBERT, 1996; BRASIL, 2010).

A origem do EPNIH remonta à década de 1950, muito antes do desenvolvimento das Boas Práticas de Fabricação (BPF) serem estabelecidas. O EPNIH logo foi reconhecido como altamente variável, consumidor de um grande número de animais, por causar grande sofrimento aos camundongos e de risco potencial para a equipe que executa o teste. Porém, na ausência de qualquer alternativa, tornou-se o teste de potência obrigatório para as vacinas contra a raiva no mundo todo (KAMPHUIS et al., 2011).

1.8 Métodos alternativos ao uso de animais de laboratório

A utilização de modelos animais em pesquisas é uma prática realizada desde a antiguidade. Foi com os estudos em animais que ocorreram as grandes descobertas da medicina, como por exemplo, a fisiologia da circulação, em 1638 por William Harvey. Mas foi a publicação de Charles Darwin, em 1859, do livro “A Origem das Espécies”, que surgiu o vínculo existente entre as espécies e assim possibilitou a extrapolação dos dados obtidos com as pesquisas em modelos animais para os seres humanos (GOLDIM; RAYMUNDO, 1997).

Essa utilização de modelos animais também despertou a sensibilidade da população da época em relação a defesa e bem-estar dos animais, sendo publicado, pelo filósofo inglês, Jeremy Benthan, em 1789, o livro “*Introduction to the principles of morals and legislation*”, onde escreveu “A questão não é, podem eles raciocinar? ou podem eles falar? Mas, podem eles sofrer? (GOLDIM; RAYMUNDO, 1997).

Marco importante para a defesa dos animais de experimentação foi a fundação da primeira Associação para Defesa dos Animais de Laboratório, frequentada pela esposa de um grande pesquisador, Claude Bernard, o qual desenvolvia experimentos com uso de animais e publicou diversos textos sobre ética com os pacientes (GOLDIM; RAYMUNDO, 1997).

Ao longo dos anos, diversas leis anticrueldade, de regulamentação do uso de animais de laboratório foram surgindo, assim como sociedades protetoras de animais. No ano de 1959, o zoologista William Russell e o microbiologista Rex Burch publicaram um livro, que trazia como proposta a utilização dos modelos animais em experimentação de forma humanizada e estabeleceram o princípio dos 3Rs da

pesquisa em animais: *Replace* (substituir), *Reduce* (reduzir) e *Refine* (refinar) (RUSSELL; BURCH, 1959).

Em 1978, a Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO) estabeleceu a Declaração Universal dos Direitos dos Animais, declarando que todos os animais possuem direito, devendo estes serem respeitados (UNESCO, 1978). No Brasil, em 1979, foi criada a Lei nº 6.638, de 8 de maio (atualmente revogada), que estabeleceu as normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais (BRASIL, 1979).

Nos últimos anos, as discussões e manifestações contra a utilização de animais em pesquisas científicas cresceu gradativamente. Um marco importante para a bioética, foi a promulgação da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca), estabelecendo o uso científico dos animais em atividades de ensino e pesquisa. A Lei também criou o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea) e as Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs), a primeira como órgão responsável por credenciar instituições que criam, mantêm e/ou utilizam animais destinados a fins científicos e de ensino e por estabelecer normas para o uso ético e humanitário dos animais de experimentação no território nacional (BRASIL, 2008b; UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO, 2017). Já as CEUAs são comissões com a finalidade de analisar, com base em princípios éticos, as propostas de atividades de ensino e pesquisa que envolvam animais do grupo Chordata, obedecendo as diretrizes normativas nacionais e internacionais, a fim de evitar abusos, usos indevidos e maus tratos a estes animais. Toda instituição que desenvolva atividades com modelos animais deve possuir uma CEUA credenciada no Concea (SÃO CAMILO, 2017).

Diante da crescente luta pelos direitos e proteção dos animais, ao próprio interesse da comunidade científica na tentativa de diminuir o número de animais utilizados em experimentos e reduzir os custos dos mesmos, a busca por métodos alternativos é cada vez mais estudada tanto para aplicação na área experimental quanto educacional (PRESGRAVE, 2002).

A necessidade de criar um centro brasileiro para validação de métodos alternativos (BraCVAM) surgiu em 2008 e, imediatamente, membros da academia, indústrias e centros de validação internacionais adotaram essa ideia. Em 2012, a cooperação entre a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e a Agência Nacional de

Vigilância Sanitária (Anvisa) iniciaram o estabelecimento do BraCVAM, criado em 2013 (PRESGRAVE et al., 2016).

Método alternativo é qualquer método que possa substituir o uso de animais em experimentos, reduzir o número necessário ou refinar a metodologia empregada, de forma a diminuir a dor ou o desconforto sofrido pelos animais nas pesquisas científicas (BRASIL, 2014a).

Com a finalidade de reduzir, substituir e/ou refinar o uso de animais em atividades de ensino e pesquisa, o Concea criou, em 3 de julho de 2014, a Resolução Normativa (RN) nº 17 que dispõe sobre o reconhecimento no Brasil de métodos alternativos validados por entidades como o BraCVAM ou por estudos colaborativos internacionais publicados em compêndios oficiais. Em seu artigo 5º, parágrafo único, a RN estabelece o prazo de até cinco anos como limite para a substituição obrigatória do método original (que utiliza animais em sua metodologia) pelo método alternativo (BRASIL, 2014a). Tal período foi projetado com base no tempo necessário para a adequação de infraestrutura laboratorial e a capacitação de recursos humanos demandadas pelos ensaios substitutivos (PORTAL BRASIL, 2014).

Atualmente, existem 17 métodos alternativos validados por centros internacionais de validação, seguindo o Guia 34 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) e que possuem aceitação regulatória internacional. Entretanto para validação de um método são necessárias diversas etapas de estudos colaborativos, realizados por vários laboratórios, onde são analisadas as variações inter e intralaboratorial e que precisam obter sucesso até chegar a ser validado pelo órgão creditado (Concea) para tal fim. Tal processo é laborioso, podendo atingir 10 anos ou mais (PRESGRAVE, 2002; BRASIL, 2014b).

Mesmo antes da criação da resolução referente aos métodos alternativos, a Ph. Bras., em seu volume 2, da 5ª edição, já contemplava em seu escopo metodologias que visam a substituição do uso dos animais, como no caso da potência do soro antirrábico, o qual além de sua metodologia usual, de vírus neutralização em camundongos, um método substitutivo ao uso de animais para a avaliação da potência de soros antirrábicos, o Teste de Rápida Inibição de Focos Fluorescentes (RIFF) também é citado como método oficial, sendo este uma neutralização do vírus rábico em células BHK21 (BRASIL, 2010). O método foi validado em estudo colaborativo conduzido pelo INCQS e o Instituto Butantan, culminando com o protocolo

apresentado como sugestão de método alternativo ao ensaio de potência em animais, que foi incluído na Ph. Bras. em 2010 (MOURA et al., 2008; BRASIL, 2010).

Entretanto, no que se refere a avaliação da potência da vacina antirrábica de uso humano ainda não existem métodos alternativos ao uso dos modelos animais efetivamente validados. Sendo assim, se faz necessária a continuidade dos estudos e pesquisas para que, no futuro, possamos substituir ou reduzir o número de animais utilizados no controle da qualidade da vacina antirrábica. Enquanto tal situação não se concretiza, trabalhamos de forma ética, humanitária, buscando reduzir ao máximo a dor e o sofrimento daqueles que são sacrificados em prol da saúde pública.

1.9 Justificativa

A Raiva é endêmica no Brasil e a ocorrência da doença em cães em regiões de fronteira, nesta década, tem resultado em uma média de 37 casos em cães/ano e cerca de dois casos humanos transmitidos por cão/ano (BRASIL, 2019). Além disto, a raiva está presente em todo território nacional em animais silvestres e em animais de produção (CALDAS, 2015).

Esta endemia gera um alto custo em assistência médica. Segundo informações do Gerente da Unidade Técnica de Vigilância de Zoonoses, Dr. Eduardo Caldas, no período de 2009 a 2013 houve uma média de 592 mil atendimentos/ano para profilaxia da raiva. De 2013 até o presente, foram gastos aproximadamente R\$ 80 milhões/ano (CALDAS, 2015).

A determinação da potência das vacinas é o mais crítico dos testes no controle da qualidade, primeiro na fase do granel e em seguida, no produto final (CABASSO, 1991), já que, a potência está diretamente ligada à eficácia do produto. Um produto sub potente eleva as chances de falhas na proteção da população alvo, com consequente desenvolvimento da doença que é praticamente letal.

Os testes em animais desempenham um papel importante nas pesquisas, desenvolvimento e no controle da qualidade de vacinas de uso humano, tanto na rotina, pós-produção e na liberação de lotes. No entanto, com o avançado estágio de desenvolvimento tecnológico, das técnicas de laboratório e da consciência ética, esforços têm sido dirigidos para a racionalização do uso de animais no controle da qualidade desses produtos (METZ et al., 2002).

No Brasil, a vacina utilizada na prevenção da raiva humana pelo MS é analisada pelo EPNIH, um teste de proteção em camundongos. Entretanto, diante do avanço da consciência ética, do bem-estar animal e da necessidade da substituição dos modelos utilizados na pesquisa, busca-se o desenvolvimento de métodos alternativos que demonstrem a consistência de produção destas vacinas.

No presente, as BPF estão implementadas para a produção de vacinas contra raiva de uso humano, e outras ferramentas e testes foram desenvolvidas para permitir que se substitua o EPNIH (KAMPHUIS et al., 2011).

A última versão da monografia de vacina contra raiva de uso humano da Farmacopeia Europeia (Ph. Eur.) já recomenda a utilização de métodos alternativos devidamente validados para determinação da potência destas vacinas, sugerindo a utilização de métodos imunoenzimáticos e sorológicos (COUNCIL OF EUROPE, 2017a).

Uma metodologia para o ensaio sorológico para determinação da potência das vacinas antirrábicas de uso humano encontra-se em desenvolvimento no Laboratório de Vacinas Virais – Raiva, do INCQS. O método é uma adaptação do EPNIH para potência da vacina antirrábica e do Teste de Rápida Inibição de Focos Fluorescentes (RIFFT) para avaliação da potência de soro antirrábico. Tem como objetivo avaliar a imunogenicidade conferida pela vacinação em camundongos (MOREIRA, 2019).

Entretanto, essa realidade ainda não se faz presente na rotina de produção e controle da qualidade das vacinas antirrábicas de uso humano no Brasil, logo são necessários esforços para minimizar o sofrimento dos animais utilizados, além da redução do número necessário deles para os testes.

Moura et al. (2009) publicaram um estudo que demonstrou os impactos de uma redução do número de animais recomendados na Ph. Bras. Para o EPNIH, na ocasião 18 por diluição, para a metade, nove. Os autores demonstraram ser viável a redução e o artigo foi literatura recomendada aos participantes do *workshop* realizado nos EUA em 2011 (STOKES et al., 2012), para avaliar quais das medidas de 3Rs seriam adotadas, a partir daquela reunião, para serem aplicadas ao EPNIH.

A OMS acaba de publicar a 5ª edição do *Laboratory Techniques in Rabies* (2018), sendo recomendado, no capítulo que descreve o EPNIH, a utilização de um ensaio modificado utilizando 10 animais por diluição (RUPPRECHT et al., 2018).

O presente estudo é uma avaliação retrospectiva de dados e considera os impactos de uma redução do número de animais por diluição de 16 para oito, sendo

uma continuação do estudo realizado em nosso laboratório que demonstrou os impactos e a viabilidade da redução do número de camundongos de 18 para nove por diluição (MOURA et al., 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Aplicar o conceito dos 3Rs avaliando os efeitos de uma redução do número de animais utilizados no EPNIH para controle da qualidade das vacinas antirrábicas de uso humano como descrito na Farmacopeia Brasileira.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a relevância e a confiabilidade do EPNIH reduzido;
- Avaliar o impacto da redução com base nos seus efeitos sobre os critérios de aceitação de ensaio;
- Fornecer subsídios, com base nos resultados, para a redução do número de camundongos utilizados no EPNIH.

3 METODOLOGIA

Para a obtenção dos valores das potências relativas avaliadas nas amostras do estudo, foram analisadas as informações e os dados inseridos nos protocolos de EPNIH, utilizados no controle da qualidade das vacinas contra raiva de uso humano, realizados no INCQS entre os anos 1997 e 2015. Os dados são referentes a 214 amostras utilizadas no artigo publicado por Moura et al. (2009) e 37 novas amostras adicionais. Amostras mais recentes, entre os anos 2016 e 2018, não foram incluídas no estudo devido ao baixo número de ensaios realizados durante esses anos, decorrente de mudança da amostragem de lote a lote, que passou a ser 25% do lote para vacinas que já tenham demonstrado consistência de produção.

3.1 Animais de laboratório

Na realização dos EPNIH para controle da qualidade das vacinas antirrábicas de uso humano analisados no presente estudo, foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss Webster* fêmeas e machos, com peso variando entre 11-15 g, provenientes da colônia convencional *outbreed* do plantel do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fiocruz. Os camundongos foram mantidos no Serviço de Animais de Laboratório (SAL) do INCQS, alojados em grupos de animais do mesmo sexo, em gaiolas padrão apropriadas, de plástico com coberturas de aço inoxidável e aparas de madeira (maravalha) como cama, sob temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$), umidade relativa 50%, fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão e com água e ração *ad libitum*. Os protocolos experimentais estão inseridos e foram realizados de acordo com o aprovado no protocolo na licença nº L-022/06 da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) de Laboratório da Fiocruz (INCQS, 2015).

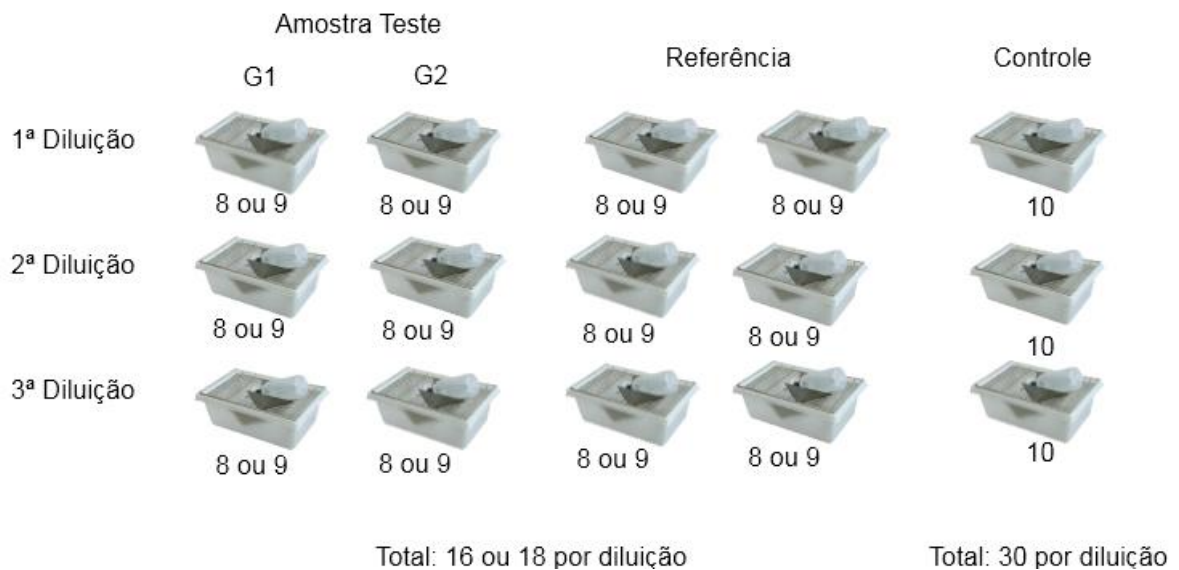
As gaiolas foram mantidas devidamente etiquetadas contendo informações como: numeração, quantidade de animais por gaiola e diluição inoculada; e mantidas organizadas em estantes.

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

O EPNIH foi executado com 18 camundongos por diluição, como descrito na 4ª edição da Ph. Bras. (BRASIL, 2004), para as 214 amostras do período 1997-2005 e utilizando 16 camundongos por diluição (Figura 5), seguindo a Ph. Bras. 5ª edição (BRASIL, 2010), para as demais 37 amostras analisadas de 2012 a 2015. Em todos os ensaios foram realizadas duas imunizações, por via intraperitoneal, em pelo menos dois conjuntos (Gaiola 1 (G1) e Gaiola 2 (G2)) de camundongos, com um intervalo de sete dias entre as imunizações (dia 0 e dia 7). Os camundongos foram imunizados com 0,5 mL de pelo menos três diluições da vacina de referência ou das vacinas em teste. Após sete dias da última vacinação (dia 14), os animais imunizados e não imunizados (grupo de controle do título do vírus) foram desafiados, por via intracerebral, com 0,03 mL da cepa CVS de vírus fixo da raiva (WILBUR; AUBERT, 1996). Os camundongos foram observados durante 14 dias e a potência relativa, expressa em IU/dose da vacina de teste, foi calculada utilizando a transformação de probitos no *software* CombiStats do *European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare* (EDQM, 2016).

Atualmente, no INCQS, o EPNIH é realizado seguindo a Ph. Bras. (2010), utilizando três diluições. Para cada diluição, 16 animais são distribuídos aleatoriamente (Figura 5) entre duas gaiolas (oito animais cada) e os resultados são registrados, separadamente, para cada gaiola. Portanto, para cada lote, são utilizadas seis gaiolas com oito animais cada (BRASIL, 2010).

Figura 5 – Esquema de distribuição do número de camundongos utilizados no EPNIH seguindo recomendações da Ph. Brasil 2004 ou 2010.



Fonte: (Do autor, 2019).

Para que o ensaio seja considerado válido, alguns critérios específicos precisam ser alcançados como: inclinação significativa, nenhum desvio significativo de linearidade ou paralelismo na curva dose-resposta, título do vírus desafio (pelo menos dez doses letais por via intracerebral em camundongos) e limites de confiança da potência estimada ($P = 0,95$) entre 25 e 400%. Para passar no teste, o lote deve manter-se com um valor mínimo de potência (1,0 UI/dose para as vacinas de cérebro de camundongos lactentes (CCLs), não mais utilizadas no presente e 2,5 UI/dose para as vacinas de cultura celular) (INCQS, 2017; BRASIL, 2010). No presente estudo, apenas os testes válidos foram considerados.

Os critérios de reteste adotados no INCQS (INCQS, 2017) para o ensaio de potência de vacinas antirrábica para uso humano são: um único teste “Não Conforme” não é considerado conclusivo, sendo a vacina retestada pelo menos uma vez. Se a média geométrica (COUNCIL OF EUROPE, 2008b) destes dois resultados passar no teste, este é conclusivo. Se essa média não passar, outro reteste é realizado e a média geométrica dos três resultados é considerada como o resultado final da potência (INCQS, 2017).

3.3 Vacinas

Um total de 251 lotes de vacinas antirrábicas para uso humano, dos quais 189 (75,30%) foram da vacina tipo CCLs e 62 (24,70%) de cultura de células (sendo 60 (96,77%) de vacinas purificadas de células vero, uma (1,61%) vacina purificada de células de embrião de patos, e uma (1,61%) vacina de células diploides humanas), foram testados em 62 ensaios independentes, utilizando 18.456 camundongos (13.332 para os lotes de vacina e 5.129 para a vacina de referência e controle do vírus desafio). Foram utilizados quatro lotes distintos de Vacinas de Referência: os lotes Nacionais de Vacinas de Referência BR006 e BR014 e as 5ª e 6ª Referências Internacionais da OMS.

3.4 Estudo retrospectivo

Visando avaliar os efeitos da redução do número de animais no EPNIH para oito por diluição, no presente estudo, as 214 amostras estudadas no artigo publicado por Moura et al. (2009) foram submetidas à exclusão de um animal por gaiola, exclusão indicada por números gerados aleatoriamente, pelo *Software* Microsoft® Excel. Os valores da potência relativa foram revistos e analisados utilizando o método de probitos, conforme descrito na Ph. Eur. (COUNCIL OF EUROPE, 2008b), com o auxílio do *software* CombiStats®. Foram acrescentados ao estudo, dados de mais 37 lotes testados utilizando 16 camundongos por diluição, atendendo às mudanças adotadas na revisão da Ph. Bras. (2010). Novos arquivos foram criados para introduzir os resultados com a redução do número de camundongos e assim obter se, também, o valor da potência relativa dos lotes com a redução para oito animais por diluição.

Para cada ensaio, três resultados para potência relativa foram obtidos e expressos em UI/dose:

- Ensaio Padrão (EP): utilizando o escore baseado no número de sobreviventes/mortos em todos os 16 animais por diluição, conforme recomendado pela Ph. Bras. (2010);
- Gaiola 1 (G1) utilizando a potência apenas dos resultados do escore das primeiras gaiolas de cada diluição;
- Gaiola 2 (G2): utilizando a potência apenas dos resultados do escore das segundas gaiolas de cada diluição.

A fim de evitar uma perda adicional de precisão, a vacina de referência sempre foi trabalhada para os cálculos com 18 (nos lotes de Moura et al., 2009) ou 16 (lotes adicionais – seguindo a Ph. Bras., 2010) animais por diluição.

Este procedimento de teste permitiu considerar o conjunto formado pelas primeiras gaiolas de cada diluição como sendo um grupo (G1) e o conjunto formado pelas segundas gaiolas de cada diluição (G2) como uma réplica do primeiro grupo.

3.5 Análise estatística dos dados

A demonstração da validade científica é uma condição necessária para a aceitação regulamentar de qualquer método de teste, incluindo métodos desenvolvidos para substituir, reduzir e refinar os testes *in vivo*. Para aceitação regulamentar do nível de dossiê de produto individual, os critérios e princípios científicos para o método de ensaio candidato a validação devem ser preenchidos e devem ser fornecidos dados significativos suficientes que demonstrem a Relevância e a Confiabilidade do método (EMA, 2017).

Visando demonstrar a relevância (exatidão) e a confiabilidade (precisão) do EPNIH com a redução do número de camundongos, os resultados obtidos com os grupos G1 e G2 foram comparados com os resultados obtidos no EP (EP versus G1 e EP versus G2) como medidas repetidas do mesmo método.

Para a análise estatística, foram utilizados os *softwares* Microsoft® Excel, Medcalc®, GraphPrism® e CombiStats®. Quando necessário, os resultados de potência foram submetidos a uma transformação logarítmica para melhorar o ajuste à distribuição normal.

Como análise exploratória dos dados, os resultados de potência foram submetidos a uma transformação logarítmica e o ajuste à distribuição normal avaliado pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. O teste de Wilcoxon para amostras pareadas foi utilizado para avaliar a presença de diferenças estatisticamente significativas entre os resultados das médias de potência entre os pares de grupos, avaliando assim a concordância entre grupos. Ambos os teste foram realizados com o auxílio do *software* Medcalc®.

Com a avaliação da normalidade e da similaridade dos resultados das médias de potência entre os pares de grupos, foram avaliados a relevância, a confiabilidade

e a capacidade do ensaio reduzido em fornecer resultados válidos. Para tal, foram determinados os seguintes parâmetros:

3.5.1 Precisão de medição

A precisão de medição é o grau de concordância entre indicações ou valores medidos obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas (VIM, 2012). Ela foi avaliada, em dados transformados em logaritmos, pelo coeficiente de variação (CV%) dentro da amostra (BLAND, 2005) entre o EP e o grupo C1 e o EP e o grupo C2, e dentro do ensaio entre os grupos C1 e C2. Isso também foi avaliado utilizando a associação de erro de medida com o tamanho da medida ao utilizar o gráfico de Bland-Altman (BLAND; ALTMAN, 1986) que foi interpretado com base na abordagem de identidade, descrito por Petersen et al. (1997), com o auxílio do *software* Medcal®. Tais métodos permitiram avaliar a confiabilidade (precisão) e relevância (concordância) dos resultados dos grupos, analisando se desviam um do outro em relação aos valores de suas potências relativas.

3.5.2 Coeficiente de concordância de correlação de Lin (CCC)

O CCC (LIN, 1989; LIN, 1992) foi utilizado, nos dados transformados logaritmicamente, para avaliar a repetibilidade nas medições contínuas utilizando um único método, medindo a concordância com a linha de identidade, ao avaliar o grau em que os pares de observações caem na linha de 45° através da origem. Ele combina um coeficiente de precisão (coeficiente de correlação de Pearson), que mede a proximidade das observações da linha ajustada e um coeficiente de exatidão, que mede a proximidade da linha ajustada com a linha de identidade. O coeficiente de precisão (r^2) e o coeficiente de exatidão estão em uma escala de 0 (sem concordância) a 100% (concordância perfeita). O CCC é o produto do coeficiente de precisão e do coeficiente de exatidão (LIN, 2000) e foi calculado com o auxílio do *software* Medcalc®. A força da concordância expressa pelo CCC entre o EP e o grupo G1 e o EP e o grupo G2 foi classificada em Insatisfatória (<0,6), Satisfatória (0,61 a 0,9) ou Excelente (0,91 a 1,0), conforme descrito por Warke et al. (2001).

3.5.3 Índice Kappa de Fleiss

A concordância entre EP e G1 e EP e G2 foi avaliada pelo índice Kappa de Fleiss (1971). Esta é uma medida de associação (correlação ou confiabilidade) que mede o grau de concordância das mensurações, realizadas por dois métodos distintos, nos mesmos indivíduos, quando os dados são categóricos (WATSON; PETRIE, 2010).

Os resultados das potências dos 251 lotes foram categorizados como “Aprovado” ou “Reprovado” e os requisitos mínimos (BRASIL, 2004; BRASIL, 2010), para a categorização, dependeram do tipo de vacina analisada (1,0 UI/dose para as CCLs e 2,5 UI/dose para as vacinas de cultura celular).

A fim de verificar a concordância, os lotes de vacinas que foram categorizados como “Reprovado” foram incluídos no estudo e tabelas de contingência foram então geradas. O índice Kappa de Fleiss foi calculado utilizando o *software* Graph Prism® e classificado como Pobre (<0,00), Leve (0,00 a 0,20), Razoável (0,21 a 0,40), Moderado (0,41 a 0,60), Substancial (0,61-0,80) ou Quase perfeita (0,81-1,00), conforme descrito por Landis e Koch (1977).

Como um único teste “Não Conforme” não é considerado conclusivo (INCQS, 2017), as amostras dos grupos do ensaio reduzido (G1 e G2), que foram reprovadas, passaram pelo procedimento de reteste. Para simular esse procedimento, a média geométrica dos grupos G1 e G2 foi calculada e utilizada para avaliar quais os lotes seriam aprovados após o resultado do reteste.

3.5.4 Intervalos de confiança

Os efeitos da redução do número de camundongos nos intervalos de confiança de 95% foram avaliados esquematicamente. Esta abordagem foi aplicada aos 251 lotes, para avaliar a precisão dos resultados ao comparar-se as potências obtidas em C1 e C2 com o EP. Os limites inferior e superior do intervalo de confiança de 95% foram expressos como uma porcentagem dos valores de potência, conforme descrito por Hendriksen et al. (1987). O aumento da amplitude para o intervalo de confiança foi avaliado comparando os limites da média dos três grupos, com o intuito de avaliar a perda de precisão decorrente da redução do número de animais.

Além disso, os critérios descritos por Weisser e Hechler (1997), ou seja, adotando um valor limite de confiança inferior, ao invés de limitar a amplitude dos intervalos de confiança para 25-400%, foram aplicados nos ensaios considerados inválidos devido a limites inferiores e/ou superiores fora das especificações.

3.5.5 Regressão, linearidade e paralelismo

Avaliou-se a incidência de ensaios estatisticamente inválidos nos grupos (G1 e G2) em decorrência da redução do número de camundongos. Tal procedimento foi possível ao avaliar o valor de *p* fornecido pelo *software* CombiStats® para os parâmetros regressão, linearidade e paralelismo. Foram considerados apenas os testes válidos do grupo EP que não apresentaram desvios nesses parâmetros.

As respostas em ensaios devem ser claramente dependentes, de alguma maneira, da dose e isso envolve dependência da resposta esperada a partir da dose, sendo expressa por uma equação de regressão da resposta em função da dose (FINNEY, 1978).

Uma transformação da resposta que produz homocedasticidade será, em geral, suficiente para proporcionar uma linearidade à regressão no log da dose em uma vasta gama de doses. A ausência de desvios de linearidade demonstra que a forma da curva de respostas é monótona, ou seja, somente aumenta ou diminui (FIELLER, 1947).

A linearidade do ensaio, considerada em validações, é diferente da consideração da forma da curva concentração-resposta. Linearidade da concentração-resposta não é um requisito da linearidade do ensaio (USP, 2012).

O paralelismo é um pré-requisito para a determinação da potência relativa em bioensaios. Envolve o teste de similaridade entre um par de curvas dose-resposta do padrão de referência e da amostra teste. A avaliação do paralelismo é um requisito listado tanto pela Farmacopeia dos Estados Unidos (USP, 2012), quanto pela Ph. Eur. (COUNCIL OF EUROPE, 2008c). O paralelismo pode ser definido pela igualdade entre as inclinações das curvas dose resposta do padrão e da amostra, dentro de um nível de aceitabilidade (COUNCIL OF EUROPE, 2008c).

3.5.6 Sensibilidade e especificidade

Para avaliar adequadamente o ensaio reduzido, foi testada a capacidade do ensaio em discriminar entre dois resultados: Aprovado ou Reprovado. Para este fim, os índices: sensibilidade e especificidade do teste foram utilizados para determinar a relevância do ensaio reduzido. Tal procedimento foi avaliado com a construção de tabelas de contingência e calculado com o auxílio do *software* Medcalc®, possibilitando verificar o desempenho da redução pela similaridade da categorização entre G1 ou G2 com o ensaio padrão.

A sensibilidade é a proporção de amostras com a condição “aprovadas” no ensaio padrão que são corretamente identificadas pelo ensaio reduzido e a especificidade é a proporção de amostras sem a condição “aprovadas” no ensaio padrão que são corretamente identificadas pelo teste reduzido. Esses dois parâmetros fornecem a ideia de quão eficiente é o desempenho de um novo teste em comparação com teste padrão ouro (ou não) existente. São importantes indicadores da exatidão de um teste (PATINO; FERREIRA, 2017).

Segundo as diretrizes da OMS (1997b), deve haver menos de 10% de conclusões contraditórias entre um método simplificado alternativo e um teste padrão. Desta forma as taxas de falso positivos e falso negativos serão avaliadas e uma vez que o peso de falso positivos, ou seja, amostras subpotentes que são aprovadas no ensaio, é grave para os pacientes, estabelecemos que o método deve apresentar uma especificidade mínima de 80%.

4 RESULTADOS

4.1 Análise exploratória dos dados - teste de Kolmogorov-Smirnov

Após a deleção de um camundongo do escore de cada gaiola das 214 amostras avaliados por Moura et al. (2009), os valores para potência relativa dessas vacinas e de mais 37 amostras, acrescentadas ao estudo, foram avaliados para o número de 16 camundongos como recomendado pela Ph. Bras. (2010) para o EPNIH e posteriormente recalculados como ensaios reduzidos e independentes de oito animais por diluição/cada que constituíram o grupo G1 e G2, representando os resultados obtidos com as gaiolas 1 e 2 de cada diluição, respectivamente.

Os conjuntos de dados de potência, transformados em logaritmos, do EP de G1 e G2 foram analisados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A média e os desvios padrão são apresentados na Tabela 1, bem como a aceitação à normalidade de cada grupo, que exibe o EP e G1 como grupos que se ajustam à normalidade, enquanto o grupo G2 ($p < 0,05$) não se ajusta a distribuição normal.

Tabela 1 – Aplicação do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov nos grupos EP, G1 e G2.

Grupo	N	Média ^a	Log ^b	95% CI ^c	SD ^d	K-S p ^e	Conclusão
EP	251	2.633	0,4206	0,3753 a 0,4659	0,3642	0,129	Aceita Normalidade
G1	251	2.734	0,4368	0,3887 a 0,4849	0,3869	0,135	Aceita Normalidade
G2	251	2.502	0,3984	0,3513 a 0,4455	0,3787	0,015	Rejeita Normalidade

Legenda: Média geométrica das potências em UI/dose^a, Média das potências em logaritmo em UI/dose^b, Intervalo de Confiança 95% para as medias em logaritmo das potência em UI/dose^c, Desvio padrão da potência em logaritmo^d, p valor para Teste Kolmogorov-Smirnov^e.

Fonte: (Do autor, 2019).

4.1.1 Comparação dos resultados de potência – teste de Wilcoxon

Os resultados de potência obtidos no ensaio padrão e nos ensaios reduzidos foram comparados pelo teste de pares combinados de Wilcoxon para dados pareados, teste não paramétrico, com a finalidade de determinar se havia diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos pares de grupos. Nenhuma

diferença significativa foi encontrada entre as médias dos pares analisados como observado na Tabela 2, onde todos os pares demonstraram um valor de $p > 0,05$.

Tabela 2 – Teste de Wilcoxon dos pares de dados.

Pares	p ^a	Nº pares	Significância
EP x G1	0,0707	251	NS
EP x G2	0,0529	251	NS
G1 x G2	0,0536	251	NS

Legenda: p valor teste T^a; NS = não significativo.

Fonte: (Do autor, 2019).

4.2 Efeitos da redução do número de animais no EPNIH – relevância e confiabilidade

4.2.1 Coeficiente de variação

Para avaliar a dispersão das mensurações, foi calculado o valor da precisão (grau de concordância entre uma série de medições da mesma amostra) pela determinação do coeficiente de variação (CV%) intra amostra entre EP e G1, e EP e G2, e o coeficiente de variação (CV%) intra ensaios entre G1-G2. Esse coeficiente expressa a variabilidade dos dados em relação à média, sendo obtido pela divisão do desvio-padrão pela média de uma distribuição de medidas (EMA, 2011).

O CV% foi de 21,63% entre EP e G1 e de 21,99% entre EP e G2. A repetibilidade intra-ensaio (G1-G2) dos resultados utilizando oito animais por diluição representou 47,58% (Tabela 3).

Tabela 3 – Coeficiente de variação (CV%) intra amostra e intra ensaio.

	Intra amostra		Intra ensaio
	EP – G1	EP – G2	G1 – G2
X Variâncias	0,007	0,007	0,029
DP	0,085	0,086	0,169
CV%	21,63	21,99	47,58

Legenda: DP – desvio padrão; CV% - Coeficiente de Variação %.

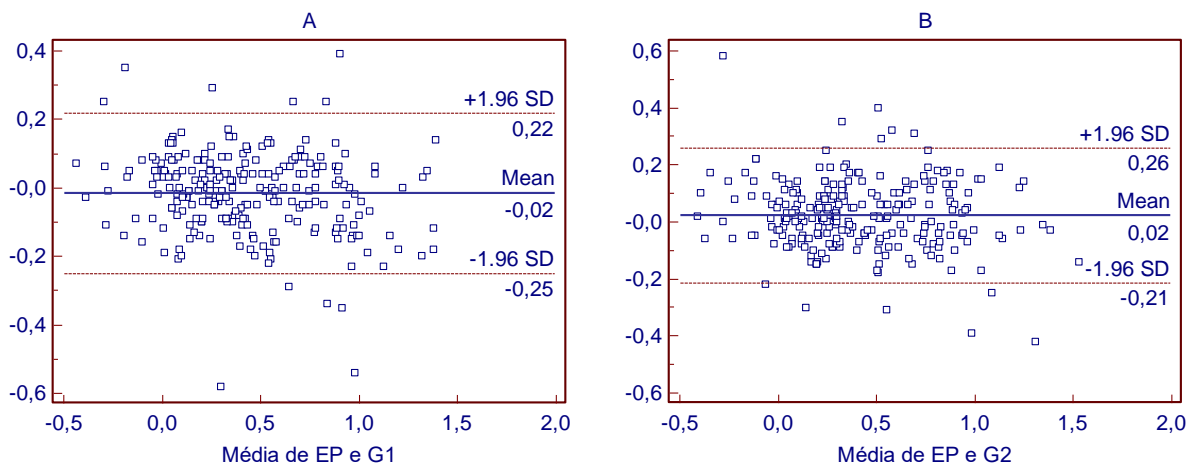
Fonte: (Do autor, 2019).

4.2.2 Gráfico de Bland-Altman

O gráfico das diferenças entre EP e G1 (ou G2) versus a média de EP e G1 (ou G2) demonstrou que as diferenças não variaram de maneira sistemática na faixa de medidas em nenhum dos grupos (Figura 46).

A tendência obtida (log 10) foi de -0,0121 (DP log 10 = 0,1122) e os limites de concordância de 95% (log 10) foram de -0,23 a 0,21 para EP menos G1 (Figura 46A). Da mesma forma, a tendência (log 10) foi de 0,0020 (DP log 10 = 0,1122) e os limites de concordância de 95% (log 10) foram de -0,22 a 0,23 para EP menos G2 (Figura 46B).

Figura 6 - Gráfico de Bland-Altman - gráficos de dispersão da diferença entre as potências em relação à média das potências.



Fonte: (Do autor, 2019).

Os gráficos de Bland-Altman também foram avaliados pela abordagem de identidade com o teste qui-quadrado (Tabela 4) utilizado para avaliar o ajuste de distribuição normal das diferenças entre EP e G1 (qui-quadrado = 0,09832; $p = 0,9520$) e entre EP e G2 (qui-quadrado = 0,3272; $p = 0,8491$). Ambas as comparações não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, portanto, aceitaram a normalidade.

Tabela 4 – Avaliação dos gráficos de Bland-Altman pela abordagem de identidade.

	EP-G1	EP-G2
Qui quadrado	0,09832	0,3272
P valor	0,9520	0,8491
P valor resumido	NS	NS
Estatisticamente Significante? ($\alpha < 0.05$)	Não	Não

Legenda: NS- não significativo.

Fonte: (Do autor, 2019).

4.3 Coeficiente de concordância de correlação de Lin

O Coeficiente de Concordância de Correlação (CCC) entre os resultados de EP e G1 foi de 0,9486 (IC95% = 0,9349 a 0,9595), com precisão de 95,72% (r^2) e exatidão de 99,72%. O CCC entre os resultados de EP e G2 foi de 0,9459 (IC 95% = 0,9313 a 0,9575), com precisão de 94,83% (r^2) e exatidão de 99,75%. Diante disso, os resultados de ambos os pares de dados apresentaram uma “Excelente concordância” (Tabela 5).

Tabela 5 – Coeficiente de concordância de correlação entre os grupos reduzidos e o ensaio padrão.

Parâmetro	EP x G1	EP x G2
Coeficiente de Concordância de Correlação (CCC)	0,9486	0,9459
Intervalo de Confiança 95%	0,9349 a 0,9595	0,9313 a 0,9575
Pearson ρ (Precisão)	0,9513	0,9483
Exatidão	0,9972	0,9975

Fonte: (Do autor, 2019).

4.4 Índice Kappa de Fleiss

O índice kappa de Fleiss foi utilizado na avaliação da concordância entre os resultados de EP e G1 e de EP e G2 quando os resultados foram classificados como Aprovado (A) ou Reprovado (R).

4.4.1 Concordância de resultados

Das 251 amostras, 226 (90,04%) foram aprovadas e 25 (9,96%) foram reprovadas no EP e são consideradas, respectivamente, como verdadeiros positivos e verdadeiros negativos. Dentre as amostras aprovadas, 199 (79,68%) demonstraram uma perfeita concordância nos três grupos. Nas amostras que foram reprovadas, 15 (5,58%) também obtiveram perfeita concordância nos grupos EP, G1 e G2. Obteve-se um total de resultados concordantes aprovados e reprovados, nos três grupos, de 214 amostras (85,26%). Em relação às amostras discordantes ao ensaio padrão (EP), das 251 amostras, elas foram responsáveis por 14,74% ($n = 37$) das amostras (Tabela 6).

Tabela 6 – Categorização dos resultados como “Aprovado” ou “Reprovado”, por grupo, com base na potência mínima requerida.

EP-G1-G2	N	%	Concordância
AAA	199	79,68	C
RRR	15	5,58	(85,26%)
RAR	5	1,99	D-I
RRA	4	1,59	(3,98%)
RAA	1	0,40	
AAR	13	5,18	D-II
ARA	13	5,18	(10,76%)
ARR	1	0,40	
Total	251	100	100

Legenda: EP = Ensaio padrão; G1 = Gaiolas 1; G2 = Gaiolas 2N = Número de amostras; A = Aprovado; R = Reprovado; C = Concordante; D = Discordante; I = Falso positivo; II = Falso negativo.
Fonte: (Do autor, 2019).

Obteve-se um índice kappa de Fleiss de 0,611, classificado como substancial (IC95% = 0,456 a 0,766) quando os resultados do grupo EP foram comparados com os resultados do grupo G1, com um número de concordâncias observadas de 231 amostras (92,03% das observações) e esperada de 199,6 (79,51%). Enquanto que para G2 o índice kappa foi de 0,636, também classificado como substancial (IC95% 0,487 a 0,786), quando comparado aos resultados do grupo EP, com um número de concordâncias observadas de 232 amostras (92,43% das observações) e concordância esperada de 198,8 (79,19%) (Tabela 7). Para ambos os grupos se esperava que o número de concordâncias ao acaso fosse de 196,5 das amostras (78,28%) no grupo G1 e 198,0 das amostras (78,88% das observações) para o grupo G2.

Tabela 7 – Tabela de contingência para o cálculo do índice de Kappa de Fleiss entre os grupos EP/G1 (Tab. 7a) e EP/G2 (Tab. 7b)

Tab. 7a	EP/G1	EP A	EP R	Total
	G1A	212	6	218
	G1 R	14	19	33
	Total	226	25	251
	DP		0,079	
	K		0,611	
	Concordância Observada		231	
	Concordância Esperada		199,6	

Tab. 7b	EP/G2	EP A	EP R	Total
	G2 A	212	5	217
	G2 R	14	20	34
	Total	226	25	251
	DP		0,076	
	K		0,636	
	Concordância Observada		232	
	Concordância Esperada		198,8	

Legenda: EP = Ensaio padrão; G1 = Gaiolas 1; G2 = Gaiolas 2; A = Aprovado; R = Reprovado; K = Kappa de Fleiss.

Fonte: (Do autor, 2019).

Em uma análise global, houve concordância nos três grupos em 214 amostras verdadeiro positivas e verdadeiro negativas (85,26%) e resultados contraditórios em 37 amostras (14,74%) sendo 10 resultados falso positivos (3,98%) e 27 resultados falso negativos (10,76%). Onde das 10 amostras falso positivas, reprovadas no grupo EP, foram aprovadas no teste nos dois grupos (1), nos grupos G1 (5) e em G2 (4) (n= 10) e das 27 amostras falso negativos, aprovadas no grupo EP, foram reprovadas nos grupos G1 (13), G2 (13) e em ambos os grupos (1) (n=27) (Tabela 8).

4.4.2 Simulação de reteste para resultados contraditórios

As vacinas que não foram aprovadas no teste de potência são testadas novamente e para simular um reteste, a média dos grupos G1 e G2 foi calculada e as taxas de falsos positivos e negativos foram reavaliadas. O número de resultados contraditórios caiu para 2 falsos positivos (0,79%) e 0 falsos negativos em 251 amostras (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultados discordantes, expressos em UI/dose e categorizados como “Aprovado” ou “Reprovado” nos grupos EP, G1 e G2 e no reteste (média). (continua)

AMOSTRA	TIPO	EP ¹	G1 ¹	G2 ¹	MÉDIA	CLASS	FALSO
01	CCL	0,90	1,17	0,65	0,91	RARR	POSITIVO
02	CCL	0,84	1,30	0,56	0,93	RARR	
03	VERO	2,03	2,82	1,49	2,16	RARR	
04	VERO	1,01	3,87	0,27	2,07	RARR	
05	CCL	0,95	1,56	1,02	1,29	RAAA	
06	CCC	0,67	0,38	1,12	0,75	RRAR	
07	CCL	0,87	0,73	1,05	0,89	RRAR	
08	CCL	0,97	0,92	1,06	0,99	RRAR	
09	CCL	0,99	0,44	1,93	1,18	RRAA	
10	VERO	2,10	2,82	0,88	1,85	RARR	
11	VERO	5,13	17,84	2,06	8,34	AARA	
12	CCL	1,00	1,11	0,91	1,01	AARA	
13	CCL	1,35	0,95	1,86	1,40	ARAA	
14	CCL	1,27	0,92	1,72	1,32	ARAA	

Tabala 8 - Resultados discordantes, expressos em UI/dose e categorizados como “Aprovado” ou “Reprovado” nos grupos EP, G1 e G2 e no reteste (média). (conclusão)

AMOSTRA	TIPO	EP ¹	G1 ¹	G2 ¹	MEDIA	CLASS	FALSO
15	CCL	1,09	0,99	1,06	1,03	ARAA	NEGATIVO
16	CCL	1,11	0,98	1,25	1,11	ARAA	
17	CCL	1,05	0,98	1,11	1,04	ARAA	
19	CCL	1,28	0,96	1,70	1,33	ARAA	
20	CCL	1,02	0,84	1,25	1,05	ARAA	
21	CCL	1,00	0,81	1,23	1,02	ARAA	
22	VERO	2,68	4,02	1,96	2,99	AARA	
23	CCL	1,06	1,21	0,91	1,06	AARA	
24	CCL	1,17	1,64	0,81	1,23	AARA	
25	CCL	1,10	1,32	0,93	1,12	AARA	
26	CCL	1,01	1,58	0,60	1,09	AARA	
27	VERO	3,06	4,46	2,10	3,28	AARA	
28	CCL	1,33	1,83	0,97	1,40	AARA	
29	CCL	1,26	1,71	0,90	1,31	AARA	
30	CCL	1,00	1,52	0,60	1,06	AARA	
31	CCL	1,22	1,58	0,96	1,27	AARA	
32	CCL	1,05	1,20	0,93	1,07	AARA	
33	CCL	1,19	0,97	1,43	1,20	ARAA	
34	CCL	1,33	0,96	1,87	1,39	ARAA	
35	CCL	1,32	0,97	1,85	1,38	ARAA	
36	VERO	3,17	4,56	2,14	3,29	AARA	
37	VERO	3,06	2,34	3,54	2,98	ARAA	

Legenda: ¹ Potência em UI/dose; CCL – cérebro camundongo lactente (potência mínima requerida 1 UI/dose); VERO – célula vero (potência mínima requerida 2,5 UI/dose); A – Aprovado; R – Reprovado. Fonte: (Do autor, 2019).

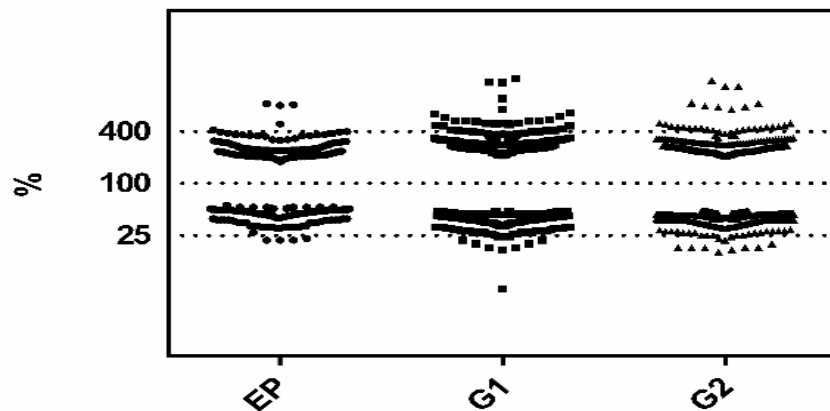
4.5 Efeitos nos intervalos de confiança

4.5.1 Intervalo de confiança de 95%

Para que um ensaio seja considerado válido, os intervalos de confiança para o valor de potência calculado, que expressam a precisão com que a potência foi

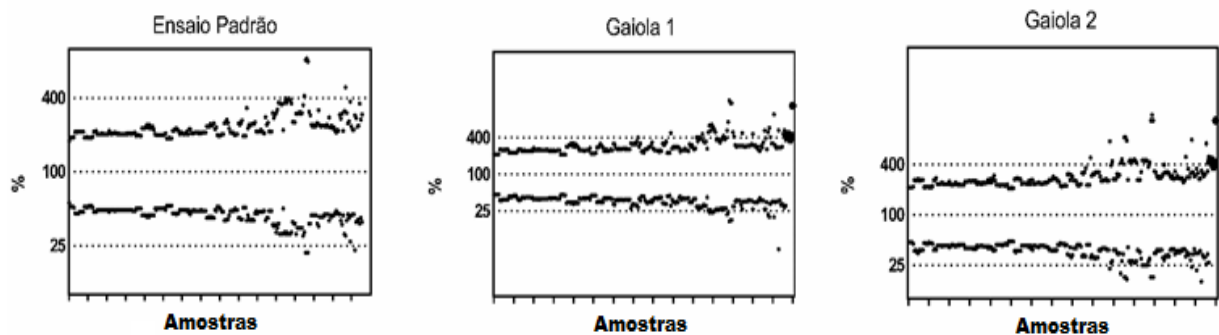
determinada no ensaio, deve estar entre 25–400%. Seis amostras (2,39%) no EP apresentaram resultados fora destes limites, enquanto que, no grupo G1 ocorreram 29 resultados (11,55%) fora dos limites de intervalos de confiança e no grupo G2, ocorreram 31 resultados de IC não conformes (12,35%), não atingindo os requisitos preconizados pela Ph. Bras., OMS e Ph. Eur. A Figura 7 compara o efeito da redução do número de camundongos na amplitude dos limites inferiores e superiores de confiança de 95%, representados como porcentagem de potência, dos três ensaios, enquanto que a Figura 8 demonstra a distribuição de cada amostra, dentro de cada ensaio, em relação ao limite de confiança.

Figura 7 – Comparação do efeito da redução do número de camundongos por diluição no EPNIH no intervalo de confiança 95% nos três grupos.



Fonte: (Do autor, 2019).

Figura 8 - Efeito da redução do número de camundongos por diluição no EPNIH no intervalo de confiança 95% em cada grupo.



Fonte: (Do autor, 2019).

Foram avaliadas as 251 amostras e as médias dos limites de confiança estão apresentadas na Tabela 9. O aumento na amplitude dos limites de confiança em relação à EP foi de 40,10% para o grupo G1 e de 33,50% para o grupo G2 quando a diferença entre a média dos limites de confiança inferior e superior foi comparado com aqueles obtidos com o EP (Tabela 9).

Tabela 9 – Avaliação do limite de confiança 95%.

Grupo	N	LCI^a	LCS^b	Amplitude^c	Aumento
EP	251	45	242	197	-
G1	251	37	313	276	40,10%
G2	251	38	301	263	33,50%

Legenda: a – Média % do limite inferior de confiança da potência; b – Média % do limite superior de confiança da potência; c – diferença entre a e b.

Fonte: (Do autor, 2019).

4.5.2 Requisito mínimo para limite inferior de confiança de potência

O efeito da adoção de um “requisito mínimo para um limite de confiança menor da potência estimada” em vez de usar o intervalo de confiança de 25 a 400% foi testado. Com esta abordagem, no grupo EP das seis amostras que apresentaram IC inválidos, cinco apresentaram limite inferior superior aos 25% do requisito mínimo de potência e, portanto, seriam consideradas válidas com a adoção deste critério. No grupo G1, 28 em 29 ensaios seriam aproveitadas e no grupo G2, 28 em 31 ensaios inválidos seriam aproveitados. Os valores mínimos sugeridos devem ser de 0,625 UI / dose para vacinas de cultura celular (25% de 2,5 UI / dose) e 0,25 UI / dose para Vacina de CCL (25% de 1,0 UI / dose). As amostras que não cumpriram esse critério e continuaram reprovadas foram aquelas que já haviam sido reprovadas pelo requerimento mínimo de potência (Tabela 10).

Tabela 10 – Comparação do número de amostras reprovadas pelo IC em relação as aprovadas ao avaliar o limite inferior de confiança de potência.

Amostra ¹	Reprovada IC	Reprovada Potência	Aprovada LI ≥25%
EP	6	1	5
G1	29	1	28
G2	31	3	28

Legenda: 1 Grupo a que pertence a amostra; IC – intervalo de confiança; LI – limite inferior
Fonte: (Do autor, 2019).

4.6 Regressão, linearidade e paralelismo

Um total de 62 corridas de ensaios que incluíam as 251 amostras foram alocadas no presente estudo. Dentre as 48 corridas de ensaios que testaram as 214 amostras selecionadas no estudo original de redução (Moura et al., 2009), todos os ensaios foram alocados por estarem em acordo com os critérios de aceitação de ensaio para regressão, paralelismo e linearidade. No entanto, com a exclusão de um camundongo por diluição, alguns ensaios passaram a violar estes critérios nos parâmetros linearidade e paralelismo, como demonstrado na Tabela 11. Estes ensaios inválidos no EP foram excluídos nas presentes análises destes critérios. Desta forma, um total de 11 corridas de ensaio foram excluídas e 51 foram consideradas na presente avaliação.

Tabela 11 – Valores para linearidade e paralelismos dos grupos EP, G1 e G2. (continua)

Ensaio	EP		G1		G2	
	Par	Lin	Par	Lin	Par	Lin
1	0,023	0,972	0,134	0,970	0,225	0,741
2	0,196	0,754	0,703	0,775	0,143	0,524
3	0,521	0,576	0,436	0,611	0,437	0,382
4	0,867	0,020	0,935	0,276	0,832	0,095
5	0,160	0,470	0,640	0,603	0,380	0,778
6	0,347	0,852	0,427	0,762	0,331	0,766
7	0,807	0,664	0,278	0,557	0,311	0,830
8	0,873	0,110	0,476	0,436	0,412	0,187
9	0,123	0,812	0,053	0,760	0,259	0,627
10	0,773	0,263	0,577	0,288	0,826	0,451
11	0,154	0,181	0,146	0,378	0,384	0,091
12	0,294	0,034	0,473	0,095	0,133	0,003
13	0,663	0,497	0,275	0,049	0,797	0,056
14	0,855	0,402	0,667	0,400	0,948	0,802
15	0,605	0,515	0,383	0,296	0,902	0,558
16	0,417	0,713	0,365	0,936	0,238	0,915
17	0,009	0,771	0,029	0,386	0,278	0,999
18	0,147	0,338	0,047	0,228	0,057	0,195
19	0,264	0,383	0,137	0,866	0,841	0,151

Tabela 11 – Valores para linearidade e paralelismos dos grupos EP, G1 e G2. (continuação)

Ensaio	EP		G1		G2	
	Par	Lin	Par	Lin	Par	Lin
20	0,597	0,908	0,121	0,597	0,800	0,986
21	0,193	0,847	0,709	0,878	0,595	0,653
22	0,909	0,031	0,594	0,276	0,598	0,130
23	0,841	0,994	0,518	0,731	0,884	0,802
24	0,745	0,545	0,370	0,152	0,174	0,892
25	0,974	0,278	0,933	0,159	0,748	0,147
26	0,666	0,737	0,771	0,859	0,487	0,909
27	0,637	0,049	0,721	0,054	0,721	0,054
28	0,860	0,126	0,535	0,268	0,448	0,110
29	0,930	0,256	0,811	0,354	0,540	0,161
30	0,245	0,243	0,982	0,630	0,115	0,183
31	0,287	0,225	0,170	0,115	0,287	0,225
32	0,061	0,511	0,332	0,506	0,074	0,240
33	0,377	0,744	0,911	0,597	0,181	0,779
34	0,434	0,147	0,176	0,284	0,800	0,308
35	0,653	0,971	0,384	0,954	0,787	0,655
36	0,008	0,522	0,011	0,688	0,100	0,152
37	0,349	0,004	0,924	0,142	0,177	0,015
38	0,203	0,053	0,144	0,093	0,599	0,051
39	0,531	0,595	0,591	0,653	0,422	0,838
40	0,651	0,693	0,935	0,792	0,564	0,665
41	0,179	0,751	0,460	0,732	0,191	0,785
42	0,224	0,902	0,278	0,813	0,166	0,952
43	0,024	0,592	0,037	0,583	0,047	0,655
44	0,968	0,719	0,688	0,767	0,927	0,786
45	0,320	0,905	0,223	0,895	0,720	0,783
46	0,860	0,989	0,844	0,969	0,880	0,991
47	0,292	0,535	0,234	0,818	0,763	0,706
48	0,817	0,052	0,770	0,312	0,809	0,287
49	0,852	0,735	0,868	0,754	0,727	0,771
50	0,344	0,085	0,145	0,157	0,541	0,034
51	0,366	0,085	0,419	0,816	0,623	0,028
52	0,030	0,414	0,104	0,630	0,184	0,757
53	0,946	0,134	0,777	0,346	0,976	0,267
54	0,339	0,530	0,212	0,483	0,830	0,573

Tabela 11 – Valores para linearidade e paralelismos dos grupos EP, G1 e G2. (conclusão)

Ensaio	EP		G1		G2	
	Par	Lin	Par	Lin	Par	Lin
55	0,272	0,879	0,632	0,878	0,093	0,906
56	0,517	0,718	0,678	0,282	0,481	0,632
57	0,563	0,248	0,637	0,182	0,916	0,066
58	0,661	0,249	0,692	0,128	0,797	0,748
59	0,235	0,392	0,653	0,524	0,130	0,613
60	0,008	0,322	0,028	0,721	0,005	0,324
61	0,733	0,127	0,689	0,298	0,963	0,388
62	0,488	0,957	0,162	0,764	0,838	0,610
N = 62	6	5	5	1	2	4

Legenda: Par – Paralelismo; Lin – Linearidade; N – número de amostras. Valores assinalados em cinza apresentaram-se inválidos por não apresentarem linearidade e/ou paralelismo e aqueles em vermelho não participaram da análise.

Fonte: (Do autor, 2019).

Em todas as 51 corridas de ensaio houve regressão estatisticamente significativa nos três grupos, EP, G1 e G2, com valor de $p \leq 0,05$. A incidência de testes estatisticamente inválidos devido à não linearidade foi de um em 51 (1,96%) no grupo G1 e dois em 51 (3,92%) no grupo G2. A incidência de testes estatisticamente inválidos devido ao não paralelismo foi de um em 51 (1,96%) no grupo G1, enquanto que G2 não demonstrou desvio de paralelismo. O número total de ensaios estatisticamente inválidos devido à não linearidade e / ou não paralelismo foi de dois em 51 (3,92%) em ambos os grupos (Tabela 12).

Levando em conta o número de ensaios que apresentaram desvios de linearidade e de paralelismo no EP com a redução para oito animais, a taxa de testes estatisticamente inválidos devido à não linearidade foi de cinco em 62 (8,06%), e a taxa devido ao não paralelismo foi de seis em 62 (9,68%), o total de ensaios inválidos foram 11 em 62 (17,74%).

Tabela 12 - Avaliação dos critérios estatísticos de aceitação de ensaios regressão, paralelismo e linearidade dos 62 ensaios utilizados no estudo, nos grupos EP, G1 e G2.

Grupo	N	Condições para rejeição de ensaios					
		Regressão		Paralelismo		Linearidade	
		P >0,05	%	P <0,05	%	P <0.05	%
EP	62	0	0	6	9,68	5	8,06
G1	51	0	0	1	1,96	1	1,96
G2	51	0	0	0	-	2	3,92

Legenda: N – número de corridas.

Fonte: (Do autor, 2019).

4.7 Sensibilidade e especificidade

Na avaliação da relevância do ensaio reduzido em relação ao EP, no grupo G1 a Sensibilidade foi 93,81% (89,82% a 96,57%) e a Especificidade foi 76,00% (54,87% a 90,64%). O que equivale a dizer que o ensaio reduzido utilizando G1, em relação ao EP, detecta em média 93% das amostras aprovadas no EP como aprovadas, e 89% com uma probabilidade de 95%, e uma média de 76% das amostras reprovadas no EP como reprovadas, mas 55% com uma probabilidade de 95%. No grupo G2 a Sensibilidade foi 93,81% (89,82% a 96,57%) e a Especificidade foi 80,00% (59,30% a 93,17%). O que equivale a dizer que o ensaio reduzido no grupo G2, em relação ao EP detecta em média 94% das amostras aprovadas no EP como aprovadas, e 90% com uma probabilidade de 95%, e uma média de 80% das amostras reprovadas no EP como reprovadas, mas 60% com uma probabilidade de 95%. Estes dados demonstram que o ensaio reduzido é adequado para diferenciar amostras potentes e subpotentes (Tabela 13).

Tabela 13 – Avaliação dos parâmetros sensibilidade e especificidade dos ensaios reduzidos G1 e G2.

Estatística	G1		G2	
	Valores	IC 95%	Valores	IC 95%
Sensibilidade	93.81%	89.82% a 96.57%	93.81%	89.82% a 96.57%
Especificidade	76.77 %	54.87% a 90.64%	80.00%	59.30% a 93.17%
Taxa de Falso Positivos	2,39%	-	1,99%	-
Taxa de Falso Negativos	5,58%	-	5,98%	-
Exatidão	92.03%	87.96% a 95.07%	92.43%	88.43% a 95.38%

Fonte: (Do autor, 2019).

5 DISCUSSÃO

O ensaio de proteção de camundongos NIH é considerado o único teste de potência aceito pela OMS para a liberação de lotes das vacinas contra raiva de uso humano (WHO, 2007). É um ensaio que demanda uma grande quantidade de animais e acarreta sofrimento considerável aos mesmos. Aplicando o conceito dos 3Rs de Russell e Burch (1959) para o uso de animais de laboratório, avaliamos o impacto da redução no número de animais (de 16 para oito por diluição) na estimativa da potência de acordo com as recomendações de Hendriksen et al. (1987, 2004), Weisser e Hechler (1997), Bruckner et al. (1988, 2003) e Moura et al. (2009).

Ao avaliarmos o conjunto de dados do EP, G1 e G2, apenas um dos grupos (G2) não se ajustou a uma distribuição normal, conforme determinado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, onde o valor de p foi menor que o nível de significância ($p < 0,05$), rejeitando-se assim a hipótese de normalidade. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas entre as médias dos pares (EP x G1, EP x G2 e G1 x G2) analisados pelo teste de Wilcoxon para dados pareados ranqueados, onde obteve-se um valor- p do teste $> 0,05$ demonstrando que as diferenças entre os grupos podem ser geradas aleatoriamente, mas não são estatisticamente significativas.

A dispersão de medição determinada pelo coeficiente de variação dentro da amostra (BLAND, 2005) entre o EP e G1 e entre o EP e G2 foi de 21,63% e 21,99%, respectivamente. Enquanto que o coeficiente de variação dentro dos ensaios, entre os grupos G1 e G2, foi de 47,58%. Considerando o estabelecido pela OMS (1997a), os resultados possuem uma variabilidade aceitável, pois ensaios *in vitro* e *in vivo* podem apresentar uma variabilidade acima de 50%, indicando uma boa repetibilidade do ensaio reduzido.

Na análise gráfica de EP menos G1 e EP menos G2, quando tratados como medidas repetidas, não são observadas tendências significativas. Não há mudanças nas diferenças em função da magnitude das medidas em qualquer um dos dois grupos (BLAND; ALTMAN, 1986), apresentando uma homocedasticidade (variância constante dos erros experimentais para observações distintas) na distribuição das diferenças.

Aplicando a abordagem de identidade, a distribuição das diferenças não se desviaram mais do que a imprecisão inerente do ensaio, assumindo uma distribuição

normal dos resultados. Isso demonstra a boa repetibilidade dos resultados entre o EP e G1 e entre o EP e G2.

O CCC demonstrou “Excelente Concordância” entre os resultados do EP e G1 e entre o EP e G2 (força de concordância = 0,95), conforme classificação de Warke et al. (2001), que demonstraram que o ensaio NIH reduzido pode fornecer resultados comparáveis aos do EPNIH padrão.

Os índices kappa de Fleiss obtidos com os resultados de potência categorizados (Aprovado ou Reprovado) entre o EP e G1 e entre o EP e G2 demonstraram "Concordância Substancial" (LANDIS; KOCH, 1977). A taxa de falsos negativos observados nos grupos G1 e G2 foi de 5,18% e 5,97%, respectivamente. Houve uma baixa taxa de falsos-positivos com 1,99% para ambos os grupos. Segundo as diretrizes da OMS (1997b), deve haver menos de 10% de conclusões contraditórias entre um método simplificado alternativo e um teste padrão. A incidência de resultados contraditórios no grupo G1 foi de 7,17% e 7,97% no grupo G2, ambos significativamente abaixo de 10%.

Todas as amostras que não passam no EPNIH devem ser retestadas e os resultados combinados por média geométrica a cada reteste, sendo a média dos dois ou três resultados considerada o resultado final (INCQS, 2017). Quando o reteste foi simulado, utilizando o grupo G2 como o reteste do grupo G1, e vice-versa, das 37 amostras com resultados discrepantes, nenhuma permaneceu falso negativo e duas permaneceram falso positivos, havendo uma queda no número de resultados contraditórios.

A precisão dos valores de potência é indicada pelos limites de confiança de 95% (HENDRIKSEN et al., 1987). A Ph. Eur., Ph. Bra. e a OMS recomendam um intervalo de 25 a 400% para os limites de confiança no EPNIH (COUNCIL OF EUROPE, 2008a; BRASIL, 2010; WHO, 2007). No presente estudo, 6 em 251 amostras (2,39%) no EP, 29 (11,55%) no grupo G1 e 31 em 251 amostras (12,35%) no grupo G2 não atenderam a essa exigência (25% - 400%). Portanto, houve um aumento médio de cinco vezes mais ensaios inválidos em relação aos seis obtidos no EP, nos grupos G1 e G2 decorrente da redução do número de animais testados. Os resultados encontrados concordam com os observados por Hedriksen et al. (1987) e Moura et al. (2009) ao avaliarem o número de resultados inválidos por estarem fora do limite de confiança 95% em ensaios reduzidos.

Quando aplicado um limite de confiança inferior de 25% da potência requerida nas amostras consideradas inválidas, como sugerido por Weisser e Hechler (1997), em vez de restringir o intervalo de confiança a 25 a 400%, passaram a ser aceitos 83,33% dos ensaios inválidos devido IC no EP, 96,51% no grupo G1 e 90,32% no grupo G2. Tal procedimento já é utilizado satisfatoriamente em outros testes de potência como nas vacinas bacterianas (difteria, tétano, coqueluche), onde o valor mínimo de 25% da potência requerida, deve ser superado pelo limite de confiança inferior para garantir uma potência adequada (HENDRIKSEN et al., 1987). Os resultados também demonstraram que a adoção de um limite de confiança inferior de 25% evitaria o reteste de vacinas que já teriam atingido os requisitos mínimos de potência no primeiro teste e assim reduziria o número de animais necessários para aprovação dessas vacinas.

A incidência de ensaios estatisticamente inválidos devido à não linearidade e/ou não-paralelismo foi de 3,92% (dois em 51) tanto para o grupo G1 quanto para G2. Essa incidência está dentro do estipulado pela OMS, onde são aceitáveis menos de 20% de rejeições devido a desvios de linearidade ou paralelismo (WHO, 1997b). Hendriksen et al. (1987) relataram três de 38 (7,89%) ensaios inválidos devido a não-paralelismo ou não-linearidade em seu estudo avaliando reduções no número de animais de 20 para 12, a fim de avaliar a potência dos componentes da vacina contra difteria. Moura et al. (2009) relataram 7,84% de ensaios inválidos devido a desvios de linearidade e paralelismo no EPNIH utilizando 18 animais por diluição e um aumento de 3,9% nesta taxa quando realizada uma redução para nove animais por diluição em estudo como o presente.

Bruckner et al. (1988) afirmaram ser impossível reduzir o número de camundongos utilizados no EPNIH para menos de dez, pois produziria resultados muito menos precisos. Weisser e Hechler (1997) sugeriram deixar em aberto o número de animais necessários para o ensaio, ficando cada laboratório responsável por determinar ou confirmar o número de animais necessários para satisfazer os requisitos de um teste válido. Além disso, Weisser e Hechler (1997) sugeriram a existência de evidências, baseadas nos resultados do teste NIH para vacinas veterinárias, de que esse número poderia ser reduzido para dez animais por diluição. Moura et al. (2009) demonstraram que uma redução do número de camundongos para nove por diluição no EPNIH para vacinas de uso humano, fornece resultados

concordantes com o ensaio utilizando 18 animais por diluição, na época recomendado pela Ph. Bras. (2004).

As taxas de falso positivos e falso negativos foram avaliadas de acordo com o estabelecido pela OMS (1997) de um máximo de 10% de resultados contraditórios para métodos simplificados e a sensibilidade, a especificidade, de acordo com critérios estabelecidos nesse estudo de um mínimo de 80% para a especificidade, frente ao risco da ocorrência de falso positivos para os pacientes. A sensibilidade de G1 foi de 93,33%, enquanto de G2 foi 94,22% adequadas por serem elevadas. Os dois grupos apresentaram o mesmo valor para o parâmetro especificidade (80,77%), também adequado frente ao requisito adotado de especificidade mínima de 80%. A avaliação das taxas de falso positivos e falso negativos foram adequadas em ambos os grupos frente ao estabelecido de um máximo de 10% de resultados discrepantes preconizado pela OMS. Estes resultados demonstram a relevância do ensaio reduzido na determinação da potência de vacinas antirrábicas garantindo exatidão do EPNIH reduzido e boa capacidade na diferenciação de lotes potentes e subpotentes.

Os resultados deste estudo indicam que a modificação do EPNIH padrão com número reduzido de animais, utilizando apenas oito camundongos por diluição da vacina, parece viável para ensaios rotineiros de potência. Os ensaios com um menor número de camundongos forneceram resultados equivalentes ao EPNIH padrão, com informações estatísticas completas sobre a validade de cada determinação de potência individual. Se aplicado, resultaria em uma redução de 54,18% no número de camundongos utilizados por vacina teste, mesmo considerando um leve aumento na incidência de testes inválidos. Atualmente a OMS, para cumprir o princípio do 3Rs, que visa substituir ou reduzir o uso de animais e refinar procedimentos experimentais, sugere a adoção de um teste NIH modificado, baseado em uma única imunização, assim como descrito na Ph. Eur. para as vacinas contra raiva inativadas de uso veterinário (COUNCIL OF EUROPE, 2017b). O ensaio modificado utilizaria dez camundongos por diluição e poderia, inclusive, ser utilizada a redução no grupo das vacinas de referência (RUPPRECHT et al., 2018).

6 CONCLUSÃO

Este estudo, baseado na avaliação estatística retrospectiva de dados oriundos das análises de controle da qualidade efetuadas no INCQS, indica que uma redução de 16 para oito camundongos por diluição no EPNIH é viável e adequada para atender às exigências estatísticas para ensaios válidos. O ensaio reduzido mostrou-se relevante e confiável, no entanto, mais estudos devem ser realizados para avaliar a variabilidade inter-laboratorial (reprodutibilidade) deste protocolo alternativo.

Como uma ilustração do impacto de tal redução, os 18.456 camundongos utilizados para determinar a potência das vacinas usando o teste de proteção de camundongos NIH seriam reduzidos para 11.150 animais usando apenas oito camundongos por diluição de vacina para as vacinas teste. Tal procedimento cumpriria o princípio dos 3Rs, que visa substituir ou reduzir o uso de animais e refinar procedimentos experimentais.

Como perspectiva, espera-se uma redução considerável no uso de animais para o controle da qualidade das vacinas contra raiva de uso humano e que seja introduzida na Ph. Bras. a opção de utilização do ensaio com este fim.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales**. 3. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. p. 351-387.

ANALYSIS of biological assay. *In*: THE UNITED States Pharmacopeia. 35. National formulary 30. 35. ed. Rockville: U.S. Pharmacopeia, 2012. Chapt. 1034.

BLAND, J.M., ALTMAN, D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **Lancet**, v. 327, p.1.307–310, 1986.

BLAND, J.M. **How should I calculate a within-subject coefficient of variation?** Nova Iorque (NY), 2005. Disponível em: <http://www-users.york.ac.uk/~mb55/meas/cv.htm>. Acesso em: dez. 2018.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução RN nº 17, de 03 de julho de 2014. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 04 jul. 2014a. Disponível em: <http://www.lex.com.br/legis_25707022_RESOLUCAO_NORMATIVA_N_17_DE_3_DE_JULHO_DE_2014.aspx. Acesso em: 18 out. 2017.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução RN nº 18, de 24 de setembro de 2014. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 set. 2014b. Disponível em: http://www.lex.com.br/legis_26001436_RESOLUCAO_NORMATIVA_N_18_DE_24_DE_SETEMBRO_DE_2014.aspx. Acesso em: 18 out. 2017.

BRASIL. Lei nº 6638, de 08 de maio de 1979. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 mai. 1979. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/1970-1979/L6638.htm. Acesso em: 15 out. 2017.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 09 out. 2008b. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/11794.htm. Acesso em: 15 out 2017.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Departamento de Vigilância Epidemiologia. **Manual de diagnóstico Laboratorial da Raiva**. Brasília: Ministério da saúde, 2008a. 108 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Normas Técnicas de Profilaxia da Raiva Humana**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011a. 60 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Programa Nacional de Imunizações (PNI): 40 anos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. 236 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portal da Saúde. **Situação Epidemiológica – Dados**. 2017a. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-oministerio/752-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/raiva/11431-situacaoepidemiologica-dados>. Acesso em: 16 out. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância Sanitária. **NOTA INFORMATIVA Nº 26-SEI/2017-CGPNI/DEVIT/SVS/MS**. Informa sobre alterações no esquema de vacinação da raiva humana pós exposição e dá outras orientações Brasília, DF, 17 jul 2017b. Disponível em: http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/agosto/04/Nota-Informativa-N-26_SEI_2017_CGPNI_DEVIT_SVS_MS.pdf. Acesso em: 12 dez. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância Sanitária. Portal da Saúde. Saúde de A a Z. Raiva. **Situação Epidemiológica da Raiva**. 2019. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/31/03---Tabela-1.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2019.

BRUCKNER, L., PALATINI, M., ACKERMANN, M., MÜLLER, H.K., KIHM, U. Reduction in the number of mice used for potency testing of human and animal rabies vaccines. **Experientia**, v. 44, p. 853–857, 1988.

BRUCKNER, L., CUSSLER, K., HALDER, M., BARRAT, J., CASTLE, P., DUCHOW, K., GATEWOOD, D.M., GIBERT, R., GROEN, J., KNAPP, B., LEVIS, R., MILNE, C., PARKER, S., STÜNKEL, K., VISSER, N., VOLKER, P. Three Rs approaches in the quality control of inactivated Rabies vaccines. **Atla**, v. 31, p. 429–454, 2003.

CABASSO, V.J. Local wound treatment and passive immunization. *In*: Baer, G.M. **The Natural History of Rabies**. 2. ed. Florida: Ed. CRC PRESS, 1991. p. 551– 570.

CABRAL, C. C. et al. Circulation of the rabies virus in non hematophagous bats in the City of Rio de Janeiro, Brazil, during 2001-2010. **Rev Soc Bras Med Trop**. São Paulo, v. 45, n.2, p. 180-183, 2012.

CALDAS, E.P. Situação da Raiva no Brasil. *In*: SEMINÁRIO DO DIA MUNDIAL CONTRA A RAIVA, 8., 2015, São Paulo. **Slides...** São Paulo: Ministério da Saúde, 2015. Disponível em: <http://saude.sp.gov.br/resources/institutopasteur/pdf/wrd2015/situacaodaraivanobrasil-eduardopachecodecaldas.pdf>. Acesso em: 18 out. 2017.

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO. **Comissão de Ética no Uso de Animais**. São Paulo, 2017. Disponível em: <http://www.saocamilosp.br/novo/institucional/ceua.php>. Acesso em: 18 out. 2017.

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

COUNCIL OF EUROPE. Vaccines for human use. *In*: THE EUROPEAN Pharmacopoeia. 5th. ed. Strasbourg: Council of Europea, 2003. p. 449.

COUNCIL OF EUROPE. Rabies vaccine for human use prepared in cell cultures. *In: THE EUROPEAN Pharmacopoeia*. 6th. ed. Strasbourg: Council of Europea, 2008a. p. 836–838.

COUNCIL OF EUROPE. Assays depending upon quantal responses. *In: THE EUROPEAN Pharmacopoeia*. 6th. ed. Strasbourg: Council of Europea, 2008b. p. 580–582.

COUNCIL OF EUROPE. Statistical Analysis of results of biological assays and tests. *In: THE EUROPEAN Pharmacopoeia*. 6th. ed. Strasbourg: Council of Europea, 2008c p. 571-600

COUNCIL OF EUROPE. Rabies Vaccine for Human Use Prepared in Cell Culture. *In: THE EUROPEAN Pharmacopoeia*. 8th. ed. Strasbourg *In: THE EUROPEAN Pharmacopoeia*, 2017a. p. 3952-3954.

COUNCIL OF EUROPE. Rabies Vaccine (Inactivated) for Veterinary Use. *In: THE EUROPEAN Pharmacopoeia*. 8th. ed. Strasbourg *In: THE EUROPEAN Pharmacopoeia*, 2017b. p. 1008-1011.

DAVIS, B. M.; RALL, G. F., SCHNELL, M. J. Everything You Always Wanted to Know About Rabies Virus (But Were Afraid to Ask). **The Annual Review of Virology**, EUA, v.2, p. 451-471, 2015.

DREESEN, D.W. A global review of rabies vaccines for human use. **Vaccine**, EUA, v. 15, p. 52-56, 1997.

EDQM. Council of Europe. **CombiStats v5.0**. 2016. Disponível em: www.combistats.eu. Acesso em: 20 jan. 2019.

EUROPEAN MEDICINE AGENCY. EMA. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). **Guideline on bioanalytical method validation**. Rev.1. Corr. 2. Amsterdã, jul. 2011. (EMA/CHMP/EWP/192217/2009).

EUROPEAN MEDICINE AGENCY. EMA. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). **Guideline for individual laboratories for transfer of quality control methods validated in collaborative trials with a view to implementing 3Rs**. Amsterdã, nov 2017. (EMA/CHMP/CVMP/3Rs/94436/2014).

FERNANDES, E. R. **Patogenia da raiva**: a trajetória do vírus rumo SNC. São Paulo, SP, [2015?]. 47 Slides. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/institutopasteur/pdf/wrd2015/patogeniadairaivaatrajetoriadovirusrumoaosncelaineranieranierofernandes.pdf>. Acesso em: 15 out. 2017.

FERREIRA, J. C.; PATINO, C. M. Entendendo os testes diagnósticos: parte 1. **J. Bras. Pneumol**. v. 43, p. 330, 2017.

FIELLER, E. C. Some remarks on the statistical background in bio-assay. **Analyst**, v. 72, p. 37-43, 1947.

FINNEY, D. J. **Statistical method in biological assay**. 3 ed. London: Charles Griffin & Co. London, 1978.

FLEISS, J.L. Measuring nominal scale agreement among many raters. **Psychol. Bull.**, v. 76, p. 378-382, 1971.

FLEISS, J. **Statistical methods for rates and proportions**. New York: John Wiley & Sons, 1981.

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

GOLDIM, J.R.; RAYMUNDO, M.M. **Pesquisa em saúde e os direitos dos animais**. 2. ed. Porto Alegre: HCPA, 1997. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/bioetica/animhist.htm>. Acesso em: 18 out. 2017.

HENDRIKSEN, C.F.M., VAN DER GUN, J.W., MARSMAN, F.R., KREEFTENBERG, J.G. The effects of reductions in the numbers of animals used for the potency assay of the diphtheria and tetanus components of adsorbed vaccines by the methods of the European Pharmacopoeia. **J. Biol. Stand.** v. 15, p. 353–362, 1987.

HENDRIKSEN, C.F.M. Reduction of numbers of animals used in the Quality Control of Biologicals. **Atla**, v. 32, p. 53–58, 2004.

ICH. **Topics Q6B guidance for industry**: specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products. Geneva, 1999. v. 64, p 44928.

ICH. **Topic Q2 (R1)**: validation of analytical procedures: text and methodology, Geneva, nov. 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3430.018**: ensaio de potência para vacina contra a raiva. Rev. 10. Rio de Janeiro, 2017. 25 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3340.002**: boas práticas em experimentação animal. Rev. 12. Rio de Janeiro, 2015. 16 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

KAMPHUIS E; MEYER H; GÖPFERT C; SCHILDGER H; HANSCHMANN KM; KRÄMER B; DUCHOW K. Rabies Vaccines for Human Use: Potency Testing Without Mouse Challenge? *In: WORLD CONGRESS ON ALTERNATIVES AND ANIMAL USE IN THE LIFE SCIENCES (WC8)*, 8., Montreal, 2011. **Altex Proceedings**. Montreal, 2011. v.1, p. 215-219.

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.

KOTAIT, I; CARRIERI, M. L; TAKAOKA, N. Y. **Raiva**: aspectos gerais e clínica.

São Paulo: Instituto Pasteur, 2009. (Manuais, 8). 49p.

LANDIS, J.R., KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, p. 159–174, 1977.

LIN, L.I.-K. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. **Biometrics**, v. 45, p. 255–268, 1989

LIN, L.I.-K. 1992. Assay validation using the concordance correlation coefficient. **Biometrics**, v. 48, p. 599–604, 1992.

LIN, L.I.-K. Total deviation index for measuring individual agreement with applications in laboratory performance and bioequivalence. **Stat. Med.** v. 19, p. 255–270, 2000.

MARKUS, H.L.; JOBIM, G.O.; MOURA, M.C.L. Vacina anti-rábica tipo “Fuenzalida” modificada (Cinco anos de produção e observações). **Rev. Inst. Med. Trop**, São Paulo, v.13, p.114-120, 1971.

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.; HENDRIKSEN, C.F.M.; JISKOOT, W.; KERSTEN, G.F.A. Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. **Vaccine**, v. 20, p. 2411– 2430, 2002.

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.

MOREIRA, W.C. **Desenvolvimento de ensaio sorológico alternativo riff para avaliação da potência de vacinas contra raiva de uso humano**. 156 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

MOURA, W. C.; GALLINA, N. M.F; FUCHES, R.M.M.; ROMIJN, P.C.; LEITE, J.P.G. Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study. **J. Virol. Methods**, v. 154, p. 7-13, 2008.

MOURA, W. C. **Aplicação do conceito dos Três Rs nos ensaios de Controle da Qualidade de imunobiológicos para Raiva**. 2009. 119 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

OIE. **Rabies Portal**. 2017. Disponível em: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-theworld/rabies-portal/>. Acesso em: 05 maio 2017.

OPAS. PANAFETOSA. Rabia. Sistemas de Vigilancia. Informe Epidemiologico Semanal – Rabia canina y humana. 2019. Disponível em: <http://www.panaftosa.org/infepi/rb/atlas.html?date=Semana%201>. Acesso em: 20 jan. 2019.

PORTAL BRASIL. Ciência e Tecnologia. **Concea reconhece 17 métodos alternativos ao uso de animais**. 2014. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/ciencia-etecnologia/2014/09/concea-reconhece-17-metodos-alternativos-ao-uso-de-animais>. Acesso em: 20 out. 2017.

PETERSEN, P.H; STÖCKL, D; BLAABJERG, O; PEDERSEN, B; BIRKEMOSE, E; THIENPONT, L; LASSEN, J.F; KJELDSEN, J. Graphical interpretation of analytical data from comparison of field method with reference method by use of difference plots. **Clin. Chem.** v. 43, p. 2039–2046, 1997

PRESGRAVE, O. A. F. Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador. *In*: ANDRADE, A., PINTO, S.C., OLIVEIRA, R.S. (org.). **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002. Cap. 41, p. 361-366.

PRESGRAVE, O.; MOURA, W.; CALDEIRA, C.; PEREIRA, E. BÔAS, MH.; ESQUES, C. Brazilian Center of the Validation of Alternative Methods (BraCVAM) and the process of validation in Brazil. **Altern Lab Anim**, v. 44, p. 85-90, 2016.

ROCHA, S.M. [**Valores de insumos adquiridos pelo MS de 2016 a 2018**]. Mensagem recebida por: wlamir.moura@incqs.fiocruz.br. Acesso em: 9 abr. 2019

RUPPRECHT, C. E; FOOKS, A. R; RIDDER, B. A. (ed.). The NIH Test for potency testing of vaccines. *In*: RUPPRECHT, C. E; FOOKS, A. R; RIDDER, B. A. (ed.). **Laboratory Techniques in Rabies**. 5. ed. Geneva: WHO, 2018. v. 2, cap. 42, p. 180-185.

RUSSELL, W.M.S.; BURCH, R.L. **The Principles of Human Experimental Technique**. London: Methuen. 1959.

SANOFI PASTEUR. Bula Sanofi Pasteur. **Vacina raiva (inativada)**. 2013. Disponível em: <http://file:///C:/Users/natha/Desktop/BIBLIOGRAFIAS/bula%20sanofi.pdf/>. Acesso em: 13 set. 2017.

SÃO PAULO (Estado). Governo do Estado. Secretaria de Estado da Saúde. **Instituto Pasteur**. São Paulo, 2016. Disponível em: http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/historia_01.htm. Acesso em: 15 out. 2016.

SCHNEIDER, M. C. *et al*. Controle da raiva no Brasil de 1980 a 1990. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.30, n.2, p. 196-203, 1996.

SCHROCK, R.D. Cell-Based Potency Assays: Expectations and Realities. **BioProcessing Journal**, v.11, n. 3, p. 4-12, 2012.

SELIGMANN, E.B.Jr. Potency-test requirements of the United States National Institute of Health (NIH). *In*: MESLIN, F-X; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKY, H. (ed.). **Laboratory Techniques in Rabies**. 2. ed. Geneva: WHO, 1966. p. 145.

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

STONES, W.; MCFARLAND, R.; KULPA-EDDY, J.; GATEWOOD, D.; LEVIS, R. *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. **Biological.**, v. 40, p. 369-381, 2012.

TEIXEIRA, T. F. **O vírus da raiva**. Disponível em: www.ufrgs.br/labvir/material/aularhabdovirusvirologiabasica.pptx. Acesso em: 20 jan. 2019.

TORIDO, 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. cap. 3. p. 28-51.

UNESCO. **Declaração Universal dos Direitos dos Animais**. Bruxelas: UNESCO, 1978. Disponível em: <http://www.urca.br/ceua/arquivos/Os%20direitos%20dos%20animais%20UNESCO.pdf>. Acesso em: 18 out. 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO. Centro de Ciências da Saúde. **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)**. Disponível em: <http://www.ccs.ufes.br/comiss%C3%A3o-de-%C3%A9tica-no-uso-de-animaisceua>. Acesso em: 19 out. 2017.

VACINA contra raiva uso humano. *In*: FARMACOPEIA Brasileira. 4. ed. parte 2. São Paulo: Atheneu, 2004.

VACINA raiva inativada. *In*: FARMACOPEIA Brasileira. 5 ed. parte 2. São Paulo: Atheneu, 2010.

VIM. **Conceitos fundamentais e gerais e termos Associados**. Duque de Caxias: INMETRO, 2012, 94 p.

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

WARKE, T.J; KAMATH, S; FITCH, P.S; BROWN, V; SHIELDS, M.D; ENNIS, M. The repeatability of nonbronchoscopic bronchoalveolar lavage differential cell counts. **Eur. Respir. J.** v. 18, p. 1009–1012, 2001.

WATSON, P. F.; PETRIE, A. Method agreement analysis: A review of correct methodology. **Theriogenology**. v. 73, p. 1167-1179, 2010.

WEISSER, K; HECHLER, U. Animal Welfare Aspects in the Quality Control of

Immunologicals. **A Critical Evaluation of Animal Tests in Pharmacopoeial monographs**. Nottingham: FRAME, 1997. p. 177–189.

WHO. **Expert Committee on Rabies**. Geneva: WHO, 1992. (Technical Report Series, n. 824).

WHO. Validation of analytical assays. *In*: WHO. **A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements**. Part 2: validation. Geneva: WHO, 1997a. p. 69–73. Chapter 15.

WHO. **Manual of laboratory methods for potency testing of vaccines used in the WHO expanded program on immunization**: parte 3-4. Geneva: WHO, 1997b. cap. 27, p. 162–174.

WHO. **Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs**. Geneva: WHO, 2007. TRS 941, p. 109–110.

WHO. **Presence of dog-transmitted human rabies based on most recent data points from different sources, 2010-2014**. Geneva: WHO, 2014. Disponível em: http://www.who.int/rabies/Presence_dog_transmitted_human_Rabies_2014.png?ua=1. Acesso em: 16 out. 2017.

WHO. Progress towards eliminating onchocerciasis in the WHO Region of the Americas: verification of elimination of transmission in Guatemala. **Weekly epidemiological record**. Geneva, ano 91, n. 43, p. 501 – 516, 2016. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250643/1/WER9143.pdf?ua=1>. Acesso em: 27 set. 2017.

WHO. **Whats is rabies?**. Geneva: WHO, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/rabies/about/en/>. Acesso em: 05 maio 2017.

WHO. **Epidemiology and burden disease**. Geneva: WHO, 2019. Disponível em: <http://www.who.int/rabies/epidemiology/en/>. Acesso em: 10 fev. 2019.

WILBUR, L. A; AUBERT, M. F. A. The NIH Test for potency. *In*: MESLIN, F-X; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKY, H. (ed.). **Laboratory Techniques in Rabies**. 2. ed. Geneva: WHO, 1996. p. 360-364.

WUNNER, W. H. The Chemical Composition and Molecular Structure of Rabies Viruse. *In*: BAER, G. M. **The Natural History of Rabies**. 2. ed. Florida: CRC press, 1991. p. 32-41.

WUNNER, W. H; CONZELMANN, K. K. Rabies Virus. *In*: Jackson, A. C. **Rabies: Scientific Basis of The Disease and Its Management**. 3 ed. San Diego: Elsevier, 2013. p. 18-38.