

Aplicação do conceito dos Três Rs nos ensaios de Controle da Qualidade de
imunobiológicos para Raiva

Wlamir Corrêa de Moura

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

Orientadores: Drs. José Paulo G. Leite e Phyllis Catharina Romijn

Rio de Janeiro

2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aplicação do conceito dos 3Rs nos ensaios de Controle da Qualidade de imunobiológicos para Raiva

Wlamir Corrêa de Moura

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

Aprovado:

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

Prof. _____(UFF)
Dr. Marcelo Salabert Gonzales

Prof. _____(IOC/FIOCRUZ)
Dr. José Paulo Gagliardi Leite

Orientadores: _____
Dr. José Paulo Gagliardi Leite
IOC/FIOCRUZ

Dra. Phyllis C. Romijn
PESAGRO/RJ

Rio de Janeiro

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Moura, Wlamir Corrêa de

Aplicação do conceito dos Três Rs nos ensaios de Controle da Qualidade de imunobiológicos para Raiva./ Wlamir Corrêa de Moura, Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2009.

xvi, 119 p., il., tab.

Dissertação (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2009.

Orientadores: José Paulo Gagliardi Leite e Phyllis Catharina Romijn.

1. Raiva. 2. Vacina. 3. Soro anti-rábico. 4. Potência. 5. 3Rs. 6. RFFIT. I. Título.

Título em inglês: Application of the Three Rs concept in the assays for the Quality Control of Rabies immunobiologicals

*“Quem trilha o caminho da perfeição não acumula tesouros,
Para o sábio riqueza é o que ele faz pelos outros,
Quanto mais ele pode oferecer aos outros,
Tanto mais rico se torna.
Assim como de Tao brota a vida,
Assim age o sábio,
Sem ferir ninguém.”*

Lao Tse

*....Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.*
Fernando Pessoa

*Aos meus pais, pela vida e pela
oportunidade que me proporcionaram
de ir um pouco além de onde puderam ir.*

*Às minhas fontes de inspiração e amor:
Juliana, Wlamir Filho e Hugo
por fazerem tudo valer a pena.*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente a Deus, acima de tudo.

À amiga, Dra. Márcia Andrade, Primatologia-CECAL-FIOCRUZ, que me apresentou ao Dr. José Paulo Leite como candidato a orientando.

Ao Dr. José Paulo Leite pela orientação, pela força e pela amizade.

À Dra Phyllis Romijn pela orientação e amizade.

À direção do INCQS, em especial aos Drs. André L. Gemal e Eduardo Chaves Leal que deram todo apoio a este trabalho.

Aos amigos Drs. Humberto Pinheiro de Araújo e Lúcia Maria Correia Werneck, ex-chefes do Departamento de Imunologia por sua grande ajuda em várias etapas desta empreitada.

À Dra. Isabella Fernandes Delgado, atual chefe do Departamento de Imunologia, por toda força e apoio.

Ao Dr. Jarbas Emílio dos Santos, chefe do Laboratório de Vacinas Virais pelo apoio e pela amizade.

Aos amigos do laboratório de Raiva Dejaildo Marques da Silva, Íris Parreira da Silva, Ivani Cutis dos Santos e Reginaldo Assad Miller por todo apoio, confiança e amizade.

Aos amigos: Drs. Marlon Vicente da Silva (BioManguinhos-FIOCRUZ), Márcio José de Figueiredo (UFF) e Rosinéia Correia Fernandes (Secretaria Municipal de Saúde da Cidade do Rio de Janeiro) por fazerem parte de minha história.

À minha amiga, Dra. Maria Aparecida Affonso Boller, por todo apoio e amizade.

Aos amigos do Departamento de Imunologia que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

À amiga, Dra. Maria Esther M. Tõnus, do Departamento de Microbiologia, que já fez parte da equipe do laboratório de Raiva e deixou um grande legado com sua passagem.

Às amigas do Departamento de Química, Dras. Sinéa Mendes de Andrade e Sônia Ribeiro Dória por todo interesse e apoio que manifestaram durante esta minha jornada.

Aos amigos do Departamento de Microbiologia, Drs: Ivano R. V. de Filippis Capasso, Antônio Eugênio Almeida, Maysa Beatriz Mandetta Clementino e Catia Aparecida Chaia Miranda Fernandes por todo apoio.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia e Toxicologia, Drs. André Vicente Plastino Silva e Octávio Augusto França Presgrave pelo apoio.

Ao Instituto Butantan de São Paulo, em especial às Dras. Hisako Gondo, Neuza Maria F. Gallina, Regina Maria M. Fuches e Ivone Kazuko Yamaguchi por suas colaborações e todo apoio.

Ao Instituto de Tecnologia do Paraná, em especial aos Drs. Ricardo Lima e Ângela Aparecida Preto.

Ao Drs. Fernando Leanes e Maria Cristina Schneider da OPAS pela oportunidade de ter participado da revisão das normas de produção de vacinas contra raiva na OMS em Genebra, 2003.

À Dra. Morag Ferguson do NIBSC (Inglaterra) pela oportunidade de participação no estudo colaborativo para estabelecimento do 6º padrão internacional de vacina contra Raiva em 2007-2008.

Aos Drs. Coenrad F.M. Hendriksen e Lukas Bruckner pela assessoria pessoal em validação de métodos alternativos, pelo exemplo de militância nos 3Rs e pela excelente bibliografia que publicaram nesta área.

À Dra. Maria de los Angeles Cortes Castillo da OPAS (Washington DC, EUA) por todo apoio que tem dado ao INCQS na área de materiais de referência.

Ao Dr. David le Talec da GSK-Bio (Rixensart, Bélgica), pelo auxílio em assuntos estatísticos nos trabalhos de Potencia de soros e do ensaio de potência NIH.

Ao Dr. Bertrand Poirrier da AFSSAPS (Lyon, França) por suas revisões e sugestões sobre o trabalho de ensaio de potencia NIH.

RESUMO

O presente estudo é uma aplicação prática do conceito dos Três Rs (3Rs) de Russell & Burch (1959) nos ensaios de controle da qualidade de imunobiológicos para Raiva preconizados pela Farmacopéia Brasileira através de: uma análise retrospectiva de dados para a Redução do nº de animais no Ensaio de Potencia NIH para vacina contra raiva de uso humano (*vaccinum rabiei ad usum humanum*); mudanças no método de avaliação da inativação viral destas vacinas utilizando animais e células e validação de um ensaio *in vitro* para substituir o ensaio *in vivo* no teste de potência de imunoglobulinas anti-rábicas (*Immunosera rabicum ex animali ad usum humanum* e *immunoglobulinum humanum rabicum*).

Todos os três protocolos de ensaio testados no estudo demonstraram viabilidade de utilização.

ABSTRACT

The present study is a practical application of the Russell and Burch 3Rs concept (1959) in the *in vivo* tests described in the *Farmacopéia Brasileira* for quality control of rabies biologicals by testing: A reduction in the number of mice in the NIH potency test for rabies vaccine for human use (*vaccinum rabiei ad usum humanum*); changes in the evaluation of virus inactivation method using suckling mice and cells as an alternative to the current Brazilian Pharmacopoeia official test (Reduction, Refinement and Replacement) and the validation of an *in vitro* assay to replace the *in vivo* assay for the potency test of Rabies Immunoglobulins (*Immunosera rabicum ex animali ad usum humanum e immunoglobulinum humanum rabicum*) (Replacement).

All the three assay protocols have shown viability of use.

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

3Rs – Três Erres

ATCC – American Type Culture Collection

BCG – Bacillus Calmete-Guerin

BHK – Baby Hamster Kidney

C1 – Cage 1

C2 – Cage 2

CA – Camundongos adultos

CC – Cultura de células

CEME - Central de Medicamentos

CEUAS - Comissões de Ética no Uso de Animais

CDC – Center for Disease Control

CHO Cell – Chinese Hamster Ovary Cell

CL – Camundongos lactentes

CVS - Challenge Vírus Standard

DE50 – Dose Efetiva 50%

DL50 – Dose Letal 50%

DNA – Desoxiribo Nucleic Acid

DTP – Difteria, Tétano e Pertussis

ED50 – Effective dose 50%

EDQM - European Directorate for the Quality of Medicines

EIE – Ensaio Imuno Enzimático

EPNV – Ensaio de Potencia por Neutralização Viral

EUA – Estados Unidos da América

FDA – Food and Drug Administration

GMP - Good Manufacturing Practices

HDCV – Vacina em Células Diplóides Humanas

i.c. – Intracerebral

IFD - imunofluorescência direta

Ig - Imunoglobulina

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

In vitro – Ensaios em células

In vivo – Ensaios em animais

i.p. - intra-peritoneal

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MS – Ministério da Saúde

NCVIA - National Childhood Vaccine Injury Act

NIH – National Institute of Health

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS - Organização Pan-americana de Saúde

PCECV – Vacina Purificada de Embrião de Galinha

Ph. Eur. – Farmacopéia Européia

Ph. Bras. – Farmacopéia Brasileira

PVCV – Vacina Purificada de Células Vero

rDNA – Recombinant DesoxiriboNucleic Acid

RFFIT – Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test

rHBsAg – Antígeno S recombinante do vírus da hepatite B

ST – Standard Test

SVS – Secretaria de Vigilância Sanitária

VCCL – Vacina de Cérebro de Camundongos Lactentes

VEP - Vacina de Embrião de Pato

WHO – World Health Organization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 1	Data de introdução das primeiras gerações de vacinas usadas em humanos.....	4
QUADRO 2	Gerações da vacina contra Raiva de uso humano.....	4
QUADRO 3	Experimentos animais no desenvolvimento do tratamento e prevenção da Difteria.....	6
QUADRO 4	Antitoxina e toxóide Diftérico: Desenvolvimento dos ensaios de controle da qualidade.....	6
QUADRO 5	Acidentes relacionados a Imunobiológicos.....	8
QUADRO 6	Benefícios da vacinação comparados aos casos naturais de pertussis.....	12
QUADRO 7	Ciclo de desenvolvimento de vacinas.....	16
FIGURA 1	Mapa mundial demonstrando países com presença e ausência de Raiva.....	21
FIGURA 2	Número de casos de Raiva canina e humana transmitida por cães no Brasil, de 1970 a 2005.....	23
FIGURA 3	Número de casos de Raiva Humana transmitida por cães no Brasil, de 1970 a 2008.....	24
QUADRO 8	Requerimento mínimo de potência, sugerido pela Organização Mundial de Saúde, para os diferentes tipos de vacinas.....	28
QUADRO 9	Resumo dos maiores desenvolvimentos em 3Rs no controle da qualidade de vacinas.....	30
Manuscrito 1		
FIGURA 1	Spread graphic, showing the trend line and the 95% confidence intervals.....	38
Manuscrito 2		
FIGURA 1	Bland-Altman plot (n = 214).....	46
FIGURA 2	The effect of the reduction in the number of animals per dilution on the NIH test potency results for rabies vaccine for human use.....	48
FIGURA 3	Control chart of individual-x values for logarithm of ED50 for Reference Vaccine lot BR006.....	48
Manuscrito 3		
FIGURA 1	Correlação entre a porcentagem média de positividade por diluição entre os grupos CA e CL.....	64
FIGURA 2	Correlação entre a porcentagem média de positividade dos grupos CA e CC.....	64
FIGURA 3	Correlação entre a porcentagem média de positividade dos grupos CL e CC.....	65
FIGURA 4	Correlação entre o n° de DL50 teórico e o real obtido no ensaio para o grupo CA.....	66
FIGURA 5	Correlação entre o n° de DL50 teórico e o real obtido no ensaio para o grupo de CL.....	67
FIGURA 6	Correlação entre o n° de CCID50 teórico e o real obtido no ensaio para o grupo de CC.....	68

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xiv
SUMÁRIO	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Histórico das vacinas.....	1
1.1.1. Experimentos em animais.....	4
1.1.2. Acidentes com vacinas.....	7
1.2. Controle da Qualidade.....	7
1.2.1. Segurança das vacinas.....	9
1.2.2. Manifestações contra a utilização de vacinas.....	11
1.3. Estágio atual dos imunobiológicos.....	13
1.4. Sistema de Garantia da Qualidade.....	14
1.4.1. Uso de animais de laboratório no Controle da Qualidade de Imunobiológicos.....	15
1.4.2. Ensaio de potencia.....	16
1.4.3. Padrões e preparações de referência.....	18
1.4.4. Abordagem da Consistência de Produção.....	19
1.5. Imunobiológicos para a Raiva.....	20
1.5.1. Vacinas contra Raiva no Brasil.....	24
1.5.2. Controle da Qualidade de imunobiológicos para a Raiva no Brasil.....	25
1.5.3. Determinação da potência.....	26
1.5.4. Detecção de Vírus Rábico Infeccioso Residual.....	28
1.5.5. O conceito dos 3Rs no Controle da Qualidade de imunobiológicos.....	29
1.6. Relevância deste trabalho.....	30
2. OBJETIVOS.....	33
2.1. Objetivo geral.....	33
2.2. Objetivos específicos.....	33
3. RESULTADOS.....	33
3.1. Manuscrito 1 - Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study.....	34
3.2. Manuscrito 2 - Potency evaluation of rabies vaccine for human use: the impact of the reduction in the number of animals per dilution.....	42

3.3.	Manuscrito 3 - Método Reduzido de Detecção de Vírus Rábico Infeccioso Residual em Vacinas Contra Raiva.....	52
4.	DISCUSSÃO.....	70
4.1.	Validação de um teste de potência de neutralização viral em células BHK-21 para imunoglobulinas contra raiva.....	70
4.2.	Avaliação da potência de vacinas contra raiva: impacto de uma redução no número de animais por diluição.....	72
4.3.	Método reduzido para detecção de vírus infectivo residual para vacinas contra raiva.....	78
5.	CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS.....	80
5.1.	CONCLUSÕES.....	80
5.1.1.	Ensaio de potência de neutralização viral em células BHK-21 para imunoglobulinas contra Raiva.....	80
5.1.2.	Ensaio de potência de vacinas contra Raiva.....	80
5.1.3.	Avaliação da inativação viral para vacinas contra Raiva.....	80
5.2.	PERSPECTIVAS.....	81
5.2.1.	Ensaio de potência de neutralização viral em células BHK-21 para imunoglobulinas contra Raiva.....	81
5.2.2.	Ensaio de potência de vacinas contra Raiva e Detecção de vírus rábico infeccioso residual para vacinas contra Raiva.....	81
5.2.3.	Outras vacinas e soros.....	81
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
7.	ANEXOS.....	96
7.1	Anexo 1 - Manuscrito 1	96
7.2	Anexo 2 – Manuscrito 2	104
7.3	Anexo 3.....	114
7.4	Anexo 4.....	117

1. INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRICO DAS VACINAS

As vacinas pertencem à categoria dos imunobiológicos, que são produtos elaborados por ou derivados de organismos vivos. Imunobiológicos incluem uma variedade de produtos, como as vacinas, imunoglobulinas, anticorpos monoclonais e policlonais (anti-soros) e biofármacos¹. Vacinas podem ser definidas como preparações contendo substâncias capazes de induzir uma imunidade específica e ativa contra um agente infeccioso, suas toxinas ou os antígenos elaborados por ele (COUNCIL OF EUROPE, 2008).

Historicamente o uso com sucesso das vacinas se inicia no século XVIII, quando, em 1798, o médico inglês Edward Jenner (1749-1823) introduziu na Europa a imunização contra varíola, embora as primeiras tentativas de imunoprofilaxia datem do século VI (a variolização² era praticada na China para proteger o povo da varíola).

Há uma antiga e estreita associação entre a microbiologia, desenvolvimento de vacinas e uso de animais de laboratório (HENDRIKSEN, 1991). Embora apenas na metade do século XIX a experimentação animal tenha adquirido caráter científico pleno. O postulado do bacteriologista alemão Robert Koch (1843-1910), publicado em 1884, no seu estudo “A etiologia da tuberculose” teve fundamental importância. Este postulado descreveu o critério usado para estabelecer a relação causal entre o agente e uma doença. Um dos critérios foi o da inoculação de culturas puras, do agente suspeito, em animais saudáveis, que sendo suscetíveis, desenvolveriam sintomas característicos da doença. O postulado de Koch ganhou aceitação geral em microbiologia e ajudou a derrubar a teoria da geração espontânea, que vinha sendo usada a longo tempo para explicar a origem das

¹ Medicamento obtido por alguma fonte ou processo biológico.

² Procedimento que consistia da inoculação de material retirado das pústulas de um enfermo, na pele de um indivíduo são.

doenças. Robert Koch e o químico francês Louis Pasteur (1822-1895) independentemente tiveram sucesso em demonstrar a relação causal entre as doenças infecciosas e agentes patogênicos. Devido às descobertas de Pasteur, Kock e outros cientistas da metade do século XIX, as causas de várias doenças comunicáveis foram estabelecidas na virada do século. Esta visão de etiologia, em parte pela utilização de animais de experimentação, criou bases para uma abordagem racional na luta contra as doenças mais graves. Previamente, terapias tinham bases amplamente fundadas em empirismo tradicional e raramente eram eficazes. Tétano, por exemplo, era tido como curável por sangria e pelo uso de quinino e vinho em altas doses, ou pelo uso de banhos frios (MILLER, 1983), efetivamente, não havia cura ou imunização para tétano ou nenhuma outra doença infecciosa (exceto a vacina de varíola de Jenner) até o final do século XIX (HENDRIKSEN, 2007).

A vacina de Pasteur contra a cólera aviária, desenvolvida em 1880, foi um marco na história da prevenção e terapia. Pasteur inicialmente inoculou galinhas com culturas velhas de *Pasteurella multocida*, o agente causador, levando ao desenvolvimento de poucos sintomas clínicos. Subseqüentemente, realizou um desafio com microorganismos produzidos sem condições adversas. A vacina contra cólera aviária então se tornou a primeira vacina experimentalmente desenvolvida. Para homenagear Jenner, Pasteur deu o nome de vacina (como o vírus da vacínia de Jenner) a qualquer preparação de agente patogênico atenuado que fosse posteriormente usada para imunizar contra uma doença infecciosa. Posteriormente o termo “vacinologia” foi introduzido por Jonas Edward Salk (1914-1995), em 1977, como sendo “o estudo e a aplicação dos requerimentos para a imunização eficaz”, significando nada mais do que a ciência das vacinas de A a Z (MOULIN, 1996). Em vacinologia, está incluído desenvolvimento, produção, controle da qualidade e pesquisa em itens relacionados às vacinas, como adjuvantes.

Uma das primeiras oportunidades de aplicação desta técnica para a proteção de seres humanos foi na vacina contra Raiva desenvolvida também por Pasteur e

seus colaboradores. Em 1885, utilizando medulas dessecadas de coelhos infectados com vírus rábico em um esquema vacinal que consistia de 13 inoculações, em grau decrescente de dessecação, ou seja, nas primeiras doses, as medulas eram dessecadas durante 15 dias, diminuindo progressivamente o período de dessecação das medulas a até menos do que um dia.

O esquema foi utilizado a primeira vez para tratar o jovem Joseph Meister em julho de 1885, um menino de 9 anos, que fora apresentado a Pasteur com ferimentos graves infligidos por um cão, considerado raivoso ao exame clínico. Tal vacina apresentava alta concentração de vírus viável residual (VODOPIJA & CLARK, 1991).

O jovem Joseph Meister sobreviveu e até 1886, foram descritos 688 esquemas profiláticos com apenas uma falha (BABES, apud VODOPIJA & CALRK, 1991). O “esquema de Pasteur” não apresentava regra fixa e variava de acordo com a gravidade da exposição avaliada por Pasteur e seus colaboradores e por outros que aplicavam a técnica em laboratórios pelo mundo.

Seguindo o pioneirismo do trabalho de Pasteur, vários pesquisadores iniciaram e estenderam o uso da imunização como meio de combate às doenças infecciosas (Quadro 1). O Quadro 2 demonstra cronologicamente a evolução das vacinas contra Raiva.

De todos os ramos da medicina moderna, a vacinologia pode reivindicar ser a que mais contribuiu para o alívio da miséria humana e para o aumento espetacular da expectativa de vida nos dois últimos séculos. É a única ciência que erradicou uma doença infecciosa – Varíola – responsável por 8 a 20% de todas as mortes em vários países europeus no século XVIII (ANDRÉ, 2003).

QUADRO 1- Data de introdução das primeiras gerações de vacinas usadas em humanos

Primeiras Vacinas	Após a II Guerra Mundial
<i>Séc. 18 e 19</i>	1955 Vacina de Pólio Injetável (IPV)
1798 Variola	1962 Vacina de Pólio Oral (OPV)
1885 Raiva	1963 Sarampo
1897 Peste	1967 Caxumba
<i>Séc. 20</i>	1970 Rubéola
1917 Cólera	1978 Vacina atual de Influenza
1923 Difteria	1981 Hepatite B
1926 Pertussis (Pertussis)	1990 Pneumocócica, 23valente
1927 Tuberculose (BCG)	1990 Hib
1927 Tétano	1995 Hepatitis A
1935 Febre Amarela	<i>Séc. 21</i>
1940 DTP	2006 Papilomavírus Humano
1945 Primeira vacina de Influenza	2006 Rotavírus

Fontes: (Plotkins & Mortimer, 1994, Pediatrician's guide, 2008)

QUADRO 2 – Gerações da vacina contra Raiva de uso humano

Nº	Autor	Tipo
1ª geração		
1885 ¹	Pasteur et al.	Medulas de coelho dessecadas
1887 ¹	Roux e Calmette	Conservante glicerina na vacina Pasteur
1887 ¹	Höyges	Diluições de suspensões de medulas
1908 ¹	Fermi	Fenolizada
2ª geração		
1911 ²	Semple	Inativada por fenol
1948 ^{1,4}	Koprowski	Avianizada Flury
1955 ²	Fuenzalida & Palácios	Cérebro de Camundongos Lactentes
1956 ⁴	Peck	Embrião de pato
3ª geração		
1960	Fenje	1ª Vac de cultivo células – Rim de Hamster
1966	Selimov & Acksenova	Vnukovo-32 cultivo primário - Rim de Hamster
1973-74 ³	Koprowski, Instituto Merieux	Células Diplóides Humanas
1985 ³	Montagnon et al.	Purificada de Células Vero
1984 ⁴	Gluck et al.	Purificada de Embrião de Patos
1988 ³	Barth	Purificada de Células de Embriões de Pinto

1 - com vírus viável

2 - produzida em tecido nervoso

3 - modernas vacinas purificadas de cultivo de tecido

4 - produzida em aves

1.1.1. Experimentos em animais

As experiências com animais são realizadas há mais de 2000 anos. Quando Alexandria constituía, depois de Atenas, o epicentro da ciência e da educação do mundo ocidental de então, a utilização de animais (incluindo humanos), era comum.

Esta prática conduzia a debates críticos sobre a utilização de humanos, na sua maioria escravos e criminosos. Deve-se a Erasistratus, no século III a.C., em Alexandria, o primeiro registo sobre a utilização de um animal vivo em experimentação (vivissecção) (ORLANS, 1993).

Durante o período Renascentista o interesse pelo método experimental destacou cientistas como Galileo Galilei (1564-1642) e Francis Bacon (1561-1626). Durante os séculos XVII e XVIII, a experimentação envolvendo a utilização nociva de animais tornou-se uma tradição, levando países como a França e a Inglaterra a um lugar de destaque no mundo científico. Acreditava-se naquele tempo que os animais eram incapazes de sentir dor. O filósofo francês René Descartes (1596 – 1650), ao assemelhar os animais a máquinas, forneceu o argumento filosófico essencial à continuação e ampliação deste tipo de ação em nome da ciência (ORLANS, 1993).

De fato, o século XIX, com a expansão de meios e recursos fornecidos pela Revolução Industrial, traz novo alento à experimentação com animais. Claude Bernard (1813 - 1878) é provavelmente o seu expoente máximo. Ainda neste século, a experimentação animal desempenhou um papel importante, inicialmente no estudo da etiologia, depois no desenvolvimento de métodos de tratamento e prevenção com antitoxinas e toxóides, respectivamente, e, finalmente, no desenvolvimento do controle da qualidade destas preparações. Nesta época a expectativa de vida média humana era menos da metade da expectativa de vida atual. Com taxas de mortalidade perto de 40%, a difteria era uma das mais temidas doenças epidêmicas infantis (GRUNDBACHER, 1992). O cientista alemão Emil von Behring (1854-1917) usou grande número de cobaios, ratos, camundongos, cães e outros animais para seu trabalho com soro antidiftérico. Por ter a experimentação animal desempenhado um papel importante no desenvolvimento do soro antidiftérico a aceitação pública desta experimentação, subseqüentemente, aumentou (TURNER, 1980). Na Europa, quase eliminou completamente a crescente influencia do movimento anti-vivissecção. Vários dos testes de rotina em animais, como teste de potência e uso de preparações padrão,

atualmente amplamente praticados, se originaram no desenvolvimento e testes da vacina antidiftérica (HENDRIKSEN, 1996).

No Quadro 3 estão descritos os passos mais importantes no desenvolvimento de terapia e imunoprofilaxia, e as espécies animais usadas. O Quadro 4 estão descritos os passos no desenvolvimento dos testes de controle da qualidade.

QUADRO 3 - Experimentos animais no desenvolvimento do tratamento e prevenção da Difteria

<i>Desenvolvimento</i>	Ano	Nome	Espécie*
Isolamento do microorganismo causal <i>Corynebacterium diphtheria</i>	1884	Loeffler	pombos, galinhas, coelhos, cobaios
Produção de endotoxina	1884	Roux & Yersin	várias espécies animais, COBAIOS
Demonstração do valor terapêutico da anti-toxina	1890	Behring	COBAIOS, cão, cam. Rato, várias outras espécies
Produção de anti-toxina em larga escala	1894	Roux & Martin	cão, ovelha, cabra, CAVALO, vaca
Mistura de toxina-antitoxina para imunização	1913	Behring	COBAIO
Toxóide diftérico	1923	Ramon	Várias espécies animais

* A espécie finalmente escolhida está em letras maiúsculas; Fonte: HENDRIKSEN (1996)

QUADRO 4 - Antitoxina e toxóide Diftérico: Desenvolvimento dos ensaios de controle da qualidade

<i>Desenvolvimento</i>	Ano	Nome	Espécie*
Controle da Qualidade de anti-toxinas	1892	Behring & Wernicke	cobaios
Uso de um padrão de referência no teste de potência	1897	Ehrlich	cobaios
Potência usando bioensaios de linhas paralelas	1937	Prigge	cobaios
Teste de desafio intra-dérmico múltiplo	1974	Knight	cobaios
Teste em camundongos/células Vero	1985	Kreeftenberg	Camundongos

* Espécie animal finalmente escolhida; Fonte: HENDRIKSEN (1996)

1.1.2. Acidentes com vacinas

Na virada do século XX, a crescente utilização de imunobiológicos trouxe novos problemas. Em 1901, nos Estados Unidos da América (EUA), morreram 14 crianças, em Saint Louis, por tétano causado pelo soro antidiftérico produzido em um cavalo com a doença, posteriormente, nove crianças morreram em New Jersey com o uso de uma vacina de varíola contaminada (JUNOD, 2007). Este foi o estágio inicial na adoção de padrões de controles rigorosos para a emergente indústria de produtos biológicos.

Casos de Raiva por “vírus rábico fixo”³ viável presente na vacina, são hoje bastante raros, mas tem uma longa e controversa história. Em Fortaleza, no Brasil, no ano de 1960 ocorreu o maior acidente descrito de Raiva vacinal, morreram 18 de 66 pessoas que receberam injeções de vacina do tipo Fermi imprópriamente inativada, 13 daqueles nem haviam sido expostos a animais realmente raivosos. Os períodos de incubação variaram de 4 a 13 dias. Os vírus identificados nos cérebros dos pacientes tinham “todas as características de vírus fixo” (PARÁ, 1965). No passado o diagnóstico de Raiva vacinal era mais freqüentemente considerado quando uma variedade de tipos de vacinas, com vírus com capacidade infectiva eram utilizados. Em 1975 a OMS contra indicou a utilização de vacinas com vírus rábico infectivo

1.2. CONTROLE DA QUALIDADE

Os primeiros imunobiológicos como a vacina contra varíola de Jenner, as vacinas ou o soro antierisipela de Pasteur, inicialmente não eram submetidos a nenhum controle da qualidade. Como resultado as vacinas, às vezes, continham um vírus insuficientemente inativado, eram contaminadas com outros patógenos, ou possuíam potência insuficiente.

³ Cepa de vírus que apresenta período de incubação curto, estável e reprodutível quando injetado por via intracerebral em animais susceptíveis.

Tornou-se aparente que grande diferença em qualidade entre os lotes de uma mesma vacina poderiam ocorrer e embora houvesse consciência expressa tanto na literatura médica quanto popular sobre a necessidade de regulamentação, padronização e controle da qualidade dos novos produtos biológicos, na virada do século nada estava registrado, mas apenas falado.

Em conseqüência, as primeiras regulamentações governamentais para o controle da qualidade de lotes foram introduzidas nos EUA (USDA, 1913).

Sem experimentos em animais a qualidade das vacinas não poderia ter evoluído tanto e chegado ao avançado estágio atual e o sucesso do uso em larga escala nunca teria sido possível. Historicamente, o modo pelo qual os requerimentos para imunobiológicos foram desenvolvidos foi trágico, a ocorrência de grandes acidentes (Quadro 5).

QUADRO 5: Acidentes relacionados a Imunobiológicos.

Causa	Biológico	Local	Ano	Casos	Mortes
<i>Toxina na vacina</i>	Difteria	Dallas	1929	96	10
		Concord	1924	21	n.d.
		Bridgewater	1924	22	n.d.
		Baden	1924	28	7
		Kyoto	1948	600	68
Inativação incompleta	Pólio	Cutter	1955	260	5
	Raiva	Fortaleza	1960	66	18
Contaminação com toxina	Tétano soro antidiftérico	St. Louis	1901	20	14
Cepa errada	BCG	Lubeck	1930	135	72

n.d. não disponível Fontes: HENDRIKSEN (1996) e PARÁ (1965)

Após o incidente de Cutter nos EUA em 1955, no qual 5 pessoas morreram como resultado do uso de vacina incorretamente inativada, novos requerimentos de testes de segurança foram introduzidos (ROBBINS, 1988).

Além disto, embora a vacinação seja a mais eficiente defesa desenvolvida contra doenças infecto-contagiosas, nenhuma vacina pode ser considerada 100% segura ou eficaz. Diferenças no modo como o sistema imune do indivíduo reage às vacinas colaboram para que em raras ocasiões pessoas não sejam protegidas após a imunização ou surjam efeitos adversos (ELLENBERG & CHEN, 1997; CHEN & HIBBS, 1998).

1.2.1. Segurança das vacinas

Segurança, não potência, talvez seja o mais importante requerimento de uma vacina. Efeitos adversos podem ter uma repercussão muito negativa na cobertura vacinal, porque os benefícios da vacinação não são bem claros para a população vacinada, enquanto os efeitos adversos são imediatamente aparentes. Atualmente, a segurança de vacinas é mantida pelo desenvolvimento de processos de produção consistentes, testes de segurança extensos e vigilância pós “marketing”. Em geral, administração parenteral de vacinas causa dor local e endurecimento⁴ no local de aplicação, sendo freqüente a observação de febre. No entanto, podem ocorrer efeitos moderados e até graves. São considerados efeitos moderados: condições atípicas como reações alérgicas graves, febre alta ou mudanças de comportamento; e sinais de uma reação grave: reação alérgica grave, dificuldade respiratória com rouquidão ou chiado, palidez, taquicardia, vertigem e edema de glote (CDC, 2008).

A vigilância de reações adversas pós-vacinação é de especial importância, dado que as vacinas são aplicadas em população saudável ou assintomática com o objetivo de prevenir doenças. Por isso, enquanto que para medicamentos a taxa de incidência aceitável de reações adversas seja de 1:100, para vacinas muitas

⁴ Endurecimento de tecidos orgânicos.

vezes é exigido que a incidência desses eventos seja igual ou inferior a 1:100.000 doses aplicadas (LANKINEN et al., 2004).

Na década de 1970, no Japão, Inglaterra e Suécia, a população sofreu influência da ampla publicidade das reações adversas associadas à vacinação contra pertussis. Como consequência, grande parte da população destes países deixou de ser vacinada e ocorreu o ressurgimento da doença, resultando em grandes epidemias (MORTIMER, 1994; ANDRÉ, 2003).

Nos EUA a segurança das vacinas se tornou mais proeminente também no meio dos anos 1970 com aumento do número de processos judiciais iniciados por pessoas presumidamente afetados por vacina contra Difteria, Tétano e Pertussis (DTP) (FREED et al., 1996). Decisões legais foram tomadas e reparação de danos concedidos apesar da falta de evidências científicas para suportar as queixas de injúrias físicas por vacinas (FREED et al., 1996). Como resultado destas decisões, a responsabilidade e os preços aumentaram e várias empresas paralisaram sua produção. Ocorreu falta de vacinas e as autoridades públicas de saúde ficaram em alerta para o retorno de doenças epidêmicas. Para reduzir a responsabilidade e atender às questões de saúde pública, o Congresso dos EUA aprovou o National Childhood Vaccine Injury Act (NCVIA) em 1986. Este ato foi influente de várias maneiras (CDC, 2008).

O NCVIA estabeleceu um comitê do Instituto de Medicina (EUA) para rever a literatura disponível sobre efeitos adversos de vacinas. Este grupo concluiu que havia limitações no conhecimento sobre os riscos associados às vacinas. Dos 76 efeitos adversos revistos para estabelecer uma relação causal, 50 (66%) não tinham nenhuma ou possuíam pesquisa inadequada para se tomar uma decisão (CHEN & HIBBS, 1998). Especificamente, o Instituto de Medicina (EUA) identificou os seguintes problemas:

1. Limitado conhecimento dos processos biológicos que desencadeiam reações adversas;
2. Informação incompleta ou inconsistente dos relatos individuais;

3. Estudos mal desenhados (poucos pacientes envolvidos para o período de tempo);

4. Sistema inadequado de rastrear os eventos adversos às vacinas;

5. Poucos estudos experimentais publicados na literatura médica (CHEN & HIBBS, 1998).

Progressos significativos foram obtidos nos últimos anos para monitorar efeitos adversos e conduzir pesquisa relevante à segurança das vacinas (BRINK & HINMAN, 1989; FREED et al., 1996).

Para tentar manter estes efeitos dentro de limites aceitáveis, o teste de pirogênio é realizado (METZ et al., 2002). Testes de segurança são realizados também para prevenir efeitos adversos mais sérios. Um problema potencial de vacinas atenuadas é a reversão de patogenicidade. Um risco potencial das vacinas com agentes inativados é que eles não estejam completamente inativados ou detoxificados. Vários acidentes já ocorreram, como já descrito no Quadro 5.

1.2.2. Manifestações contra a utilização de vacinas

Comprovadamente, no final do século XIX, as taxas de mortalidade já estavam declinando, antes do início do uso da imunoterapia e profilaxia, assim, o aumento da expectativa de vida devido primariamente a uma redução de mortes por doenças infecciosas, poderia ser fortemente atribuído à melhoria na nutrição, das condições de vida e de trabalho, de higiene e das condições sanitárias (McKEOWN, 1979).

A oposição à utilização de vacinas é tão antiga quanto as mesmas, tendo surgido com a introdução da vacina de Jenner. Entretanto, o movimento contra as vacinas permaneceu discreto e ineficaz a despeito de motins contra vacinas dentro do Reino Unido porque os interesses imaginários ou reais sobre a segurança vacinal eram de relevância secundária comparados aos benefícios óbvios do controle das enfermidades. O sucesso das vacinas em controlar e em eliminar doenças tem, paradoxalmente, sido a causa de um retorno de um

movimento contra as vacinas (CLASSEN, 2008; K.N.O.W. VACCINES, 2008; GLOBAL VACCINES INSTITUTE, 2008). Nos países desenvolvidos, após o controle de muitas doenças infecciosas comuns no passado como a difteria, o tétano, a poliomielite, o sarampo, a rubéola e a caxumba muitos acreditam que a vacinação não seria somente desnecessária, mas até mesmo perigosa. Isto porque consideram como “reações” todos agravos de saúde que ocorram em seguida à administração da vacina (ANDRÉ, 2002).

Longe de se esgotar, a história da resistência organizada contra a vacina e do debate gerado a partir daí tem, por vezes, caminhado para posições menos díspares e mais confluentes nas quais setores contra as vacinas têm apregoado não serem sistematicamente contra a vacinação, mas sim contra a vacinação sistemática (PONTE, 2003).

O Quadro 6 compara a frequência de reações adversas provenientes de dados de vigilância pós-imunização com dados de morbidade de infecções naturais de casos de pertussis. Pode ser visto que a vacinação apresenta ótima relação custo-eficácia.

QUADRO 6 - Benefícios da vacinação comparados aos casos naturais de pertussis

Reações Adversas	Incidência (Nº por 100.000 casos) após:		Proporção Infecção/vacinação
	Infecção	Vacinação	
Choque	—	15,0	—
Convulsões	4000	45,0	89
Encefalite	2000	1,5	1300
Dano cerebral permanente	1300	0,3	4300
Morte	2000	0,2	10.000

GALAZKA et al. (1984)

1.3. ESTÁGIO ATUAL DOS IMUNOBIOLÓGICOS

Atualmente, os Imunobiológicos são considerados as ferramentas de melhor custo/benefício na prevenção de doenças infecto-contagiosas. Como exemplo, estima-se que a imunização salve a vida de 3 milhões de crianças por ano no presente, porém, mais 2 milhões de vidas poderiam ser salvas pelas vacinas existentes (ANDRÉ, 2003). Nos próximos anos, a importância das vacinas continuará aumentando, devido à emergência de bactérias resistentes a antibióticos como *Mycobacterium tuberculosis*, o impacto de novas infecções virais como o vírus da imunodeficiência humano (HIV) e Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), aumento das ameaças biológicas (e.g. varíola e antrax), viagens globais e turismo (HENDRIKSEN, 2005). Em 2003, 26 vacinas contra agentes infecciosos estavam disponíveis no mercado (ANDRÉ, 2003). De 2003 a 2008 pelo menos mais nove vacinas foram licenciadas nos EUA (PEDIATRICIAN'S GUIDE, 2008).

As vacinas podem ser classificadas de acordo com sua metodologia de produção como:

Primeira geração: Princípio desenvolvido por Pasteur, baseadas na utilização de micro-organismos completos atenuados ou inativados ou toxinas detoxificadas. Agentes físicos ou químicos são utilizados na inativação como calor ou formaldeído. Este tipo de vacinas é caracterizado por uma alta complexidade na composição e estrutura. Exemplos deste tipo de vacinas são: vacinas contra Raiva, DTP, BCG e vacinas virais (i.e., pólio, sarampo, rubéola).

Segunda geração: Baseada no princípio das sub-unidades, que consiste no isolamento e na purificação dos componentes antígenicos (epítomos antigênicos) dos micro-organismos responsáveis por uma resposta imunológica protetora. Exemplos deste tipo de vacinas são: vacina contra Influenza (glicoproteína da membrana, hemaglutinina – HA e neuraminidase, NA), contra hepatite B (Antígeno HBs) e pertussis acelular (filamentos de hemaglutinina e toxina pertussis).

Terceira geração: Baseada na tecnologia do DNA recombinante (rDNA) com inserção de um ou mais genes de micro-organismos codificando proteínas relevantes em sistemas hospedeiros como vírus (vaccínia, adenovírus), leveduras ou células animais. A expressão destes genes induz a imunidade após a administração. Exemplo: vacina contra hepatite B derivada de leveduras e células de ovário de hamster chinês (CHO cells) (rHBsAg). Entretanto a maioria destas vacinas produzidas experimentalmente ainda não passou pela fase de registro oficial.

Novas estratégias de produção de vacinas têm resultado em produtos mais definidos, mas com menores estruturas antigênicas como sub-unidades e peptídeos. Estes produtos são menos imunogênicos comparados com vacinas celulares. Em adição, algumas vacinas novas requerem modulação da resposta imune para a imunidade mediada por células.

Os únicos adjuvantes aprovados para o uso em humanos são o hidróxido e fosfato de Alumínio. Esforços significativos são feitos hoje para desenvolver novas gerações de adjuvantes (HENDRIKSEN, 2005).

1.4. SISTEMA DE GARANTIA DA QUALIDADE

Atualmente, a qualidade de vacinas é crescentemente garantida pelo uso de processos de produção robustos e reprodutíveis. Agências reguladoras como “Food and Drug Administration” (FDA) e “European Directorate for the Quality of Medicines” (EDQM) – Farmacopéia Européia (*Ph. Eur.*), publicam requerimentos e guias para garantir níveis de qualidade mínimos, porém elevados (CASTLE, 1996).

Um dos requerimentos das Boas Práticas de Fabricação correntes (cGMP) é que os fabricantes de produtos médicos, incluindo drogas e equipamentos, tenham um programa de garantia da qualidade (CHRISTIANSEN, 1998).

Garantia da qualidade é um sistema completo de abordagem para garantir a segurança e eficácia de produtos acabados. Vai além da simples inspeção e teste. O controle da qualidade é normalmente considerado um sub-item do sistema de garantia da qualidade. É o mais básico ou mais simples tipo de programa da qualidade. Controle da qualidade primariamente consiste de inspeções e testes como meio inicial de detectar defeitos e é apenas parte do sistema de Garantia da Qualidade (CHRISTIANSEN, 1998).

Alguns dos métodos usados para produtos derivados de biotecnologia são os mesmo usados para produtos farmacêuticos tradicionais incluindo esterilidade do produto, testes de segurança em animais e potência. O uso de padrões de referência e métodos de ensaio validados para contaminantes e impurezas é similar. A diferença fundamental entre o sistema de controle da qualidade para produtos derivados de processos biotecnológicos e outros produtos farmacêuticos está nos métodos usados para determinar as características do produto: identidade, pureza e perfil de impurezas. Frequentemente, uma combinação de testes do produto final, testes em-produção e validação de processo são necessários. A complexidade desta combinação pode ser relacionada ao processo de produção usado. Parte do controle da qualidade de produtos derivados de células é a completa caracterização da linhagem celular, passando retrospectivamente por todas as fases até a origem da linhagem celular. A caracterização pode incluir testes para agentes adventícios, fenotipagem e resistência a antibióticos.

Com a finalidade de liberar um lote de um produto biológico, seus dados devem ser submetidos a agencias reguladoras para demonstrar que o produto alcança os critérios biológicos críticos (SCHIFF et al., 1992).

1.4.1. Uso de animais de laboratório no controle da qualidade de imunobiológicos

Testes em animais desempenham papel fundamental na pesquisa, no desenvolvimento e no controle da qualidade de rotina de vacinas humanas. No

mundo, o uso estimado é de 10 milhões de animais de laboratório por ano, para a produção e controle da qualidade de imunobiológicos, dos quais 80% são necessários para testar segurança e potência nos produtos finais (liberação de lotes).

O Quadro 7 descreve as fases de desenvolvimento de uma nova vacina, sendo o processo longo, oneroso e complexo, podendo levar até 12 anos (SANOFI PASTEUR, 2008).

QUADRO 7 - Ciclo de desenvolvimento de vacinas.

Fase	Importância
Estágio exploratório	Entender sobre a doença, seus dados epidemiológicos e antígenos próprios a serem usados na prevenção ou tratamento da doença
Estágio pré-clínico	Avaliar a segurança do antígeno e selecionar a melhor vacina candidata, estudos em animais de laboratório e em células
Desenvolvimento clínico	De 10 (fase I) a 1000 pessoas (fase III) serão envolvidas nos estudos clínicos e os primeiros lotes serão produzidos (lotes clínicos e lotes industriais para avaliação)
Aprovação regulatória	Todos os dados coletados durante os estágios precedentes são submetidos às autoridades de saúde pertinentes para a aprovação.
Processo de produção	≥ 22 meses para produção de cada lote de vacina
Controle da qualidade	<i>Aproximadamente 70% do tempo de produção é dedicado ao controle da qualidade</i>

Fonte: SANOFI PASTEUR (2008).

1.4.2. Ensaios de Potência

Requerimentos legais determinam que cada lote de vacina produzido tenha seu potencial de indução de imunidade protetora, após a sua administração, testado. Existe uma fundamental diferença no planejamento de testes para vacinas com agentes viáveis ou inativados. No primeiro caso, i.e., vacina de Bacillus Calmette-Guerin (BCG) e vacina pólio oral (OPV), a eficácia de cada lote de vacina é relacionada ao número de partículas, determinado tanto pela contagem ou

titulação, que é, inteiramente avaliada *in vitro*. Testes *in vivo* apenas são realizados no caso de novas cepas sementes (METZ et al., 2002).

Diferentemente das vacinas com agentes viáveis que são quantificadas por titulação *in vitro*, ensaios de potência *in vivo* são necessários para cada lote de vacina inativada. Um número de exceções existe, como o caso do teste de potência de Imunodifusão Radial Simples para vacina de influenza e EIE (ensaio Imuno-enzimático) para vacina de hepatite B de antígeno recombinante. Geralmente, potência de vacinas de uso humano é realizada em um teste de imunização-desafio usando pequenos roedores (ratos ou camundongos) como modelos experimentais.

Dependendo do tipo de vacina, diferentes “end-points” são usados, como taxas de morte/sobrevivência (vacina celular contra pertussis, toxóide diftérico e toxóide tetânico e Raiva), sinais clínicos (difteria e tétano) ou colonização (pertussis celular e acelular). Estabelecendo uma curva dose-resposta em paralelo a uma preparação de referência com título conhecido em unidades internacionais (UI/ml), a potência de uma vacina é expressa em unidades da preparação de referência, incluindo o intervalo de confiança de 95%.

Porém, um modelo de desafio nem sempre está disponível, naqueles casos em que o teste de potência é limitado à sorologia: após a imunização a resposta de anticorpos pode ser determinada pela habilidade de neutralizar o patógeno *in vitro* ou sua habilidade para matar bactérias na presença de complemento.

De natureza mais fundamental é a questão de quanto os ensaios de potência atuais justificam o uso extenso de animais de laboratório. É comum encontrar grandes variações nos resultados entre laboratórios, muito provavelmente devido às diferenças genéticas dos animais utilizados (FESTING, 1994). Assim, a maioria dos ensaios de potência apresenta uma pobre reprodutibilidade.

Em adição, a relevância dos modelos animais para a situação humana tem mudado e os testes em animais têm se tornado muito caros e se tornarão ainda mais em um futuro próximo.

O número de animais usados para controle da qualidade de vacinas pode ser reduzido drasticamente se as vacinas forem mais bem caracterizadas. O FDA usa a definição de biológico bem-caracterizado para determinar qual produto pode ser isento da liberação lote-a-lote (ZOON & GARNICK, 1998). Atualmente, a definição de biológico bem-caracterizado é: “uma entidade química da qual identidade, pureza, impurezas, segurança, potência e qualidade podem ser determinadas e controladas” (ZOON, 1998). Porém, muitas das vacinas usadas hoje não são biológicos bem-caracterizados e, portanto, a liberação de seus lotes permanecerá mandatária.

1.4.3. Padrões e preparações de Referência

Para vacinas tradicionais como DTP, Raiva ou erisipela, a potência é expressa como valor relativo. Isto é através da comparação da potência de uma vacina teste com uma vacina de referência. A OMS, a *Ph. Eur.* ou as autoridades Nacionais de Controle provêm esses padrões ou preparações de referência. Comparações entre as vacinas teste e de referência são baseadas em ensaios multi-diluição, que são realizados para registro e para liberação da potência de lotes. Esta abordagem usa grande número de animais, entretanto, isto já foi reconhecido e alguns “guidelines” hoje permitem o uso de testes com dose única (HALDER, 2001).

Também fica evidente que com o desenvolvimento de novas vacinas, as autoridades de controle e produtores terão que lidar mais e mais com aspectos de produtos específicos, ou seja, duas vacinas de dois diferentes produtores contra um mesmo agente, não podem ser comparadas, por apresentarem metodologia de produção, composição (e.g. adjuvantes, estabilizadores, antígenos, epitopos, seqüência genética) e metodologia de determinação da potência inteiramente diferentes, por isso, o uso de um único padrão universal em todo o mundo, contra

o qual seria válido testar todos produtos, não será mais possível. Para novas vacinas, por exemplo, vacinas de Haemophilus influenza b, de hepatite B recombinante, de pertussis acelular e certamente as novas combinações de vacinas a tendência é de que os produtores usem padrões clínicos para testar a consistência de produção, i.e., um padrão clínico é um lote de vacina, que tenha sido usado em estudos clínicos e demonstrado ser eficaz (DOBBELAER, 2000).

1.4.4. Abordagem da consistência de produção

Consistência é um conceito antigo que visa garantir a liberação ininterrupta de produtos eficazes e seguros e estava previsto no “*The Viruses, Serums Act*” (USDA, 1913). A abordagem de consistência implica no uso de um conjunto de parâmetros para constituir um perfil de produto (e.g. conteúdo antigênico, integridade antigênica) que pode substituir os testes para liberação correntes (HENDRIKSEN, 2006).

O perfil de um produto é estabelecido para satisfazer os reguladores no momento do licenciamento e é monitorado durante a produção sob um sistema de qualidade estrito. Os perfis de produto garantem que cada lote liberado seja similar a uma vacina produtor-específica cuja segurança e qualidade foram comprovadas, e que todas as características concordem, com as do produto licenciado, e que os resultados obtidos pelo produtor e pelo regulador também sejam concordantes.

Esta abordagem pode levar a uma redução no uso de animais, desde que um pequeno conjunto de bioensaios com animais por lote final, com limitado poder de prever o comportamento da vacina em uma população alvo, seja substituído por uma bateria de ensaios significativos com capacidade ampliada (Hendriksen, 2006). Uma melhor condução na consistência de produção através de testes durante o processamento tem permitido simplificação da liberação de protocolos (JONES & CURRIE, 1991). Em particular, relacionado ao uso de testes *in vitro*, enquanto mantendo a capacidade de demonstrar equivalência com lotes clínicos.

Na abordagem atual, cada lote é considerado único e é testado independentemente para segurança e potência, porém, existem ainda outras novas abordagens como a harmonização internacional e o reconhecimento mútuo (já realizado na Europa), onde um produto só é testado pela autoridade do país onde é produzido. Os países da comunidade européia que importam o produto reconhecem e aceitam a validade dos testes realizados.

1.5. IMUNOBIOLOGICOS PARA RAIVA

Embora tenha sido uma das primeiras doenças humanas a ter uma vacina experimentalmente desenvolvida usada com sucesso em 1885 (VODOPIJA & CLARCK, 1991), dados publicados pela OMS, colocam a Raiva (*rabhas*, Sânscrito: cometer violência), atualmente, ainda entre as dez causas mais comuns de mortes humanas no mundo (Figura 1).

Uma vez iniciados os sintomas, a doença é quase invariavelmente fatal e a notificação freqüentemente é incompleta. Ainda que medidas efetivas e não onerosas de controle estejam bem estabelecidas, sua aplicação em países em desenvolvimento é impedida por uma série de fatores econômicos, políticos e sociais e é estimado que mais de 55.000 mortes humanas ocorram anualmente, das quais, mais de 95%, ocorram na África e Ásia (WHO, 2006).

Porém, quando as novas vacinas produzidas em cultivo celular, como as de Células Diploides Humanas (HDCV), Purificada de Células Vero (PVCV), Purificada de Embrião de Galinha (PCECV), são usadas apropriadamente, podem prover 100% de proteção com alto grau de segurança, independentemente da linhagem celular utilizada (DRESSEN, 1997).

No entanto, é bem conhecido que a vacinação pós-exposição somente, pode não ser suficiente, especialmente em casos de exposição grave (grau 3) onde imunização passiva concomitante com Imunoglobulinas (Ig) G é fortemente aconselhável (WHO, 2007).

Soros de origem animal ou humana ou plasma contendo anticorpos têm sido usados mundialmente para a profilaxia e terapia de doenças infecciosas de origem conhecida e desconhecida desde o final de 1800s (CASADEVALL,1999), mas para sua utilização na Raiva, apenas na década de 1950 foi possível comprovar que a administração da combinação de vacina e soro é mais eficaz na prevenção da Raiva após exposição grave do que administração de vacinal apenas (WHO, 2007). Isto foi feito quando HABEL & KOPROWSKI (1955), avaliaram o estudo clínico realizado com 28 de 29 pessoas mordidas por um lobo raivoso no Iran.

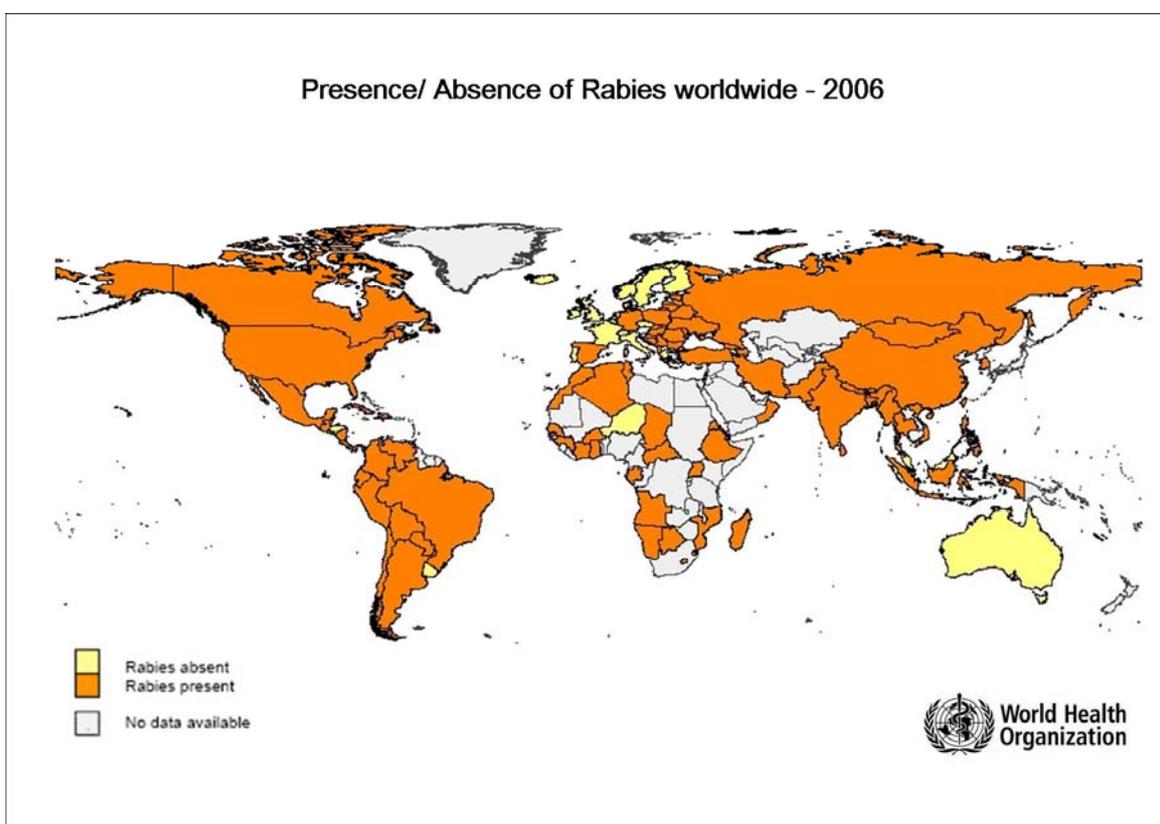


FIGURA 1 – Mapa mundial demonstrando países com presença e ausência de Raiva. Fonte (<http://www.who.int/rabies/rabiesoccurrence2006.JPG>, consultado em dezembro 2008)

Há três classes de IgG contra Raiva disponíveis atualmente para imunização passiva: a) Ig anti-rábica humana (HRIG); b) Ig anti-rábica equina (ERIG); c) Frações F(ab')₂ altamente purificadas produzidas a partir de Ig equina (WHO, 2004). Estas devem ser usadas de acordo com as recomendações da OMS nas

dosagens de 20UI/kg de peso e 40UI/Kg de peso respectivamente, aplicados em dose única e longe do sítio de inoculação da vacina (WHO, 2007).

A escassez de Ig representa um problema real em saúde pública e um novo desafio. De acordo com um estudo da OMS, a vasta maioria de 7,6 milhões de esquemas de vacinação pós-exposição realizados mundialmente em 2000 foram feitos sem a utilização de Ig devido a sua falta (WHO, 1997).

Os requerimentos de potência para as vacinas descritas na Farmacopéia Brasileira, (*Ph. Bras.*) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2004) são de no mínimo 1 UI/ml para a vacina produzida em cérebro de camundongos lactentes (VCCL) e 2,5 UI/dose para as vacinas produzidas em cultivo celular.

A dose em geral é de 1 ml para as VCCL e de 0,5 ml para a vacina em células Vero tanto para o regime pré-exposição quanto para o regime pós-exposição. 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 anticorpos neutralizantes detectáveis contra o vírus rábico podem persistir por vários anos.

A administração de Ig anti-rábica é feita para prover anticorpos vírus neutralizantes durante o espaço de tempo entre a administração da vacina e a produção de anticorpos. Uso de imunoglobulinas anti-rábicas provê uma rápida, imunidade passiva que persiste por um curto período de tempo (vida média de aproximadamente 21 dias) (CABASSO et al. 1971).

Os gastos econômicos com a Raiva nos países em desenvolvimento são estimados em US\$ 560 milhões, por ano, com profilaxia pós-exposição (WHO, 2006).

Para o controle efetivo é necessário realizar bloqueios de foco (em até 72 h), manter altas coberturas vacinais caninas; recolher animais suspeitos; realizar o censo canino; promover educação em saúde; prover profilaxia adequada em

tempo oportuno e garantir a realização do esquema de vacinação completo (SVS/MS – 2008).

As Figuras 2 e 3 mostram a evolução da Raiva canina e humana no Brasil de 1970 a 2008. O controle da doença em cães refletiu no controle da doença em humanos. O aparente aumento na década de 1970 denota a ampliação da rede de laboratórios de diagnóstico no País, assim como principalmente uma maior conscientização e certamente isto acarretou apenas uma drástica, porém não completa redução na sub-notificação da doença.

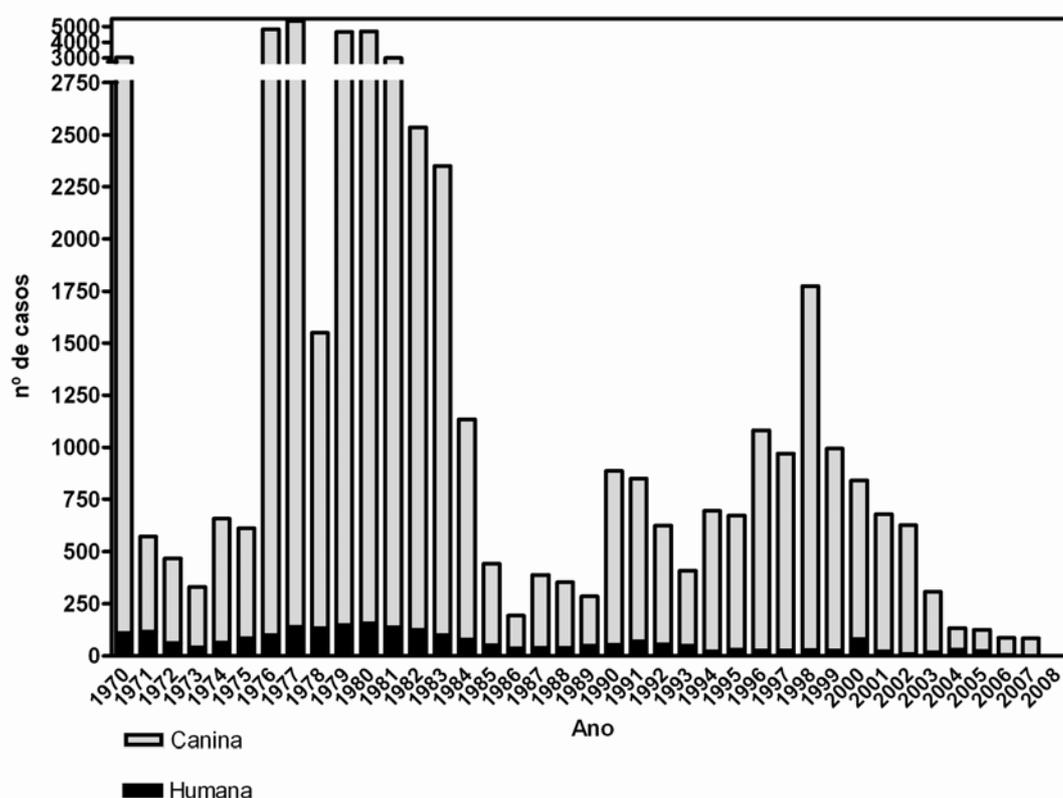


FIGURA 2 – Número de casos de Raiva canina e Raiva humana transmitida por cães no Brasil, de 1970 a 2008.

Fonte: SIEPI / OPAS / PÁNAFTOSA, dezembro de 2008, (www.siepi.panaftosa.org.br)

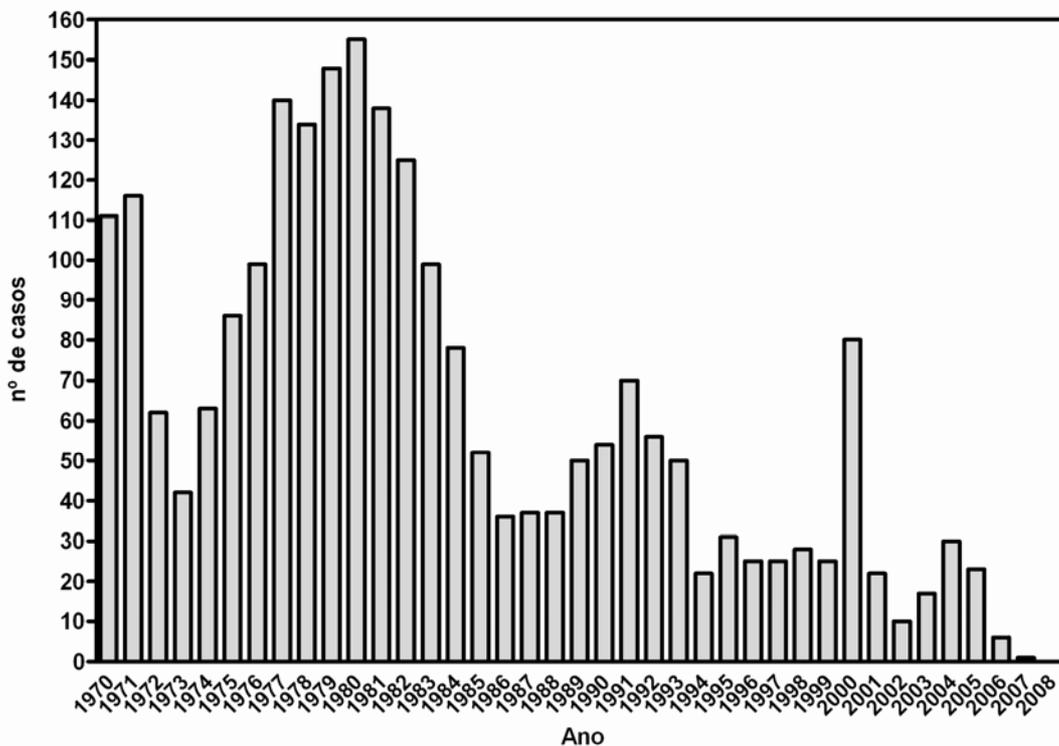


FIGURA 3 – Número de casos de Raiva Humana transmitida por cães no Brasil, de 1970 a 2008.

Fonte: SIEPI / OPAS / PÁNAFTOSA, dezembro de 2008, (www.siepi.panaftosa.org.br)

1.5.1. Vacinas contra Raiva no Brasil

A história da luta contra a Raiva no Brasil é antiga. Em fevereiro de 1888, meses antes da inauguração do grande instituto parisiense, D. Pedro II já havia fundado o Instituto Pasteur do Rio de Janeiro, ambos nasceram com a finalidade de difundir a vacina contra Raiva (BENCHIMOL, 1999). Em 1903, foi também fundado em São Paulo o Instituto Pasteur, como instituição de caráter privado, com objetivos científicos e humanitários (INSTITUTO PASTEUR de SP, 2008).

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

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

Esta vacina vem sendo utilizada no País em grande escala para cães e gatos até o presente, tendo sido utilizada em humanos até 2003, permitindo que a Raiva fosse controlada com êxito na maior parte do País (Figuras 2 e 3), apesar de toda discussão a respeito de efeitos colaterais causados por tal classe de vacinas.

O estado de São Paulo iniciou a utilização da vacina purificada produzida em células Vero (VERORAB, Aventis Pasteur, França) a partir do ano de 2000. Os demais estados seguiram utilizando a vacina produzida em cérebro de camundongos lactentes produzida 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 Aventis Pasteur, produtora francesa da vacina.

No Brasil atualmente são utilizadas Imunoglobulinas heterólogas purificadas de origem eqüídea produzidas pelo Instituto Butantan (70%) e Instituto Vital Brazil (30%) e homólogas (importadas, apenas para casos onde haja reação à Ig eqüídea).

Todos os lotes de imunobiológicos contra Raiva são controlados no INCQS.

1.5.2. Controle da qualidade de Imunobiológicos para Raiva no Brasil

O Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS), desde a sua fundação (1983) centraliza o controle de qualidade das vacinas empregadas pelo Programa Nacional de Imunizações (PONTE, 2003). Os ensaios são realizados seguindo as monografias da *Ph. Bras.*(2004) que está em sua 4^a. edição. Nesta

publicação estão descritas monografias para controle de vacinas contra Raiva inativadas e soros anti-rábicos de origem eqüina. Os ensaios biológicos preconizados para estes produtos são ensaio de potência para vacina e soro e a detecção de vírus rábico infeccioso residual da vacina contra Raiva todos *in vivo*.

1.5.3. Determinação da potência

Certamente era difícil a avaliação da potência das primeiras vacinas de tecido nervoso e como resultado raramente isto foi tentado. Com a diminuição nas taxas de casos/exposições em humanos, tornou fácil assumir que todos os produtos eram eficazes. Entretanto, o surgimento da primeira vacina não derivada de tecido nervoso, vacina de embrião de pato (VEP) (PECK et al., 1956), levou a um renovado interesse em padronização de um meio de avaliação da capacidade protetora, frente a sua reduzida antigenicidade, que era contra-balanceada pela redução da perigosa ocorrência de seqüelas do sistema nervoso central. No presente, com uma variedade extensiva de vacinas de tecido nervoso (FUENZALIDA & PALÁCIOS, 1955) e cultivos celulares como a purificada de células de embriões de galinha (BARTH et al., 1996); purificada de células diplóides humanas (BRANCHE, 1996), células de rim de hamster (FENJE, 1960, BARTH et al., 1996b) e de células Vero (MONTAGNON & FANGET, 1996) e com um potencial para adicionais tipos de vacinas produzidos por métodos de engenharia genética, a necessidade de um método padronizado de avaliação da potência protetora de vacinas é evidentemente fundamental.

Não existe um sistema de animais de laboratório ideal para demonstrar a eficácia de vacinas contra Raiva administradas após a exposição. Na ausência deste sistema, testes laboratoriais baseados em imunização pré-exposição vêm sendo usados. Normalmente, todos os testes de pré-exposição utilizam camundongos.

WEBSTER (1939) descreveu um ensaio para avaliar a potência de vacinas utilizando camundongos albinos suíços inoculados por via i.p. com 1/8 da dose recomendada para humanos de vacina diluída a 1:10, por três a seis dias

consecutivos. Três semanas após a primeira imunização um desafio com 10 a 100 DL₅₀ i.c. para camundongos era administrada. Por este método, WEBSTER demonstrou que várias vacinas de tecido nervoso contendo vírus viável e uma vacina inativada por clorofórmio eram agentes efetivos de proteção. Entretanto, apenas uma de 33 preparações comerciais de vacinas inativadas pelo fenol para uso humano, conseguiu proteger camundongos.

No Brasil, as vacinas de uso humano utilizadas pelo MS na prevenção da Raiva, têm sua potência avaliada lote a lote no INCQS/FIOCRUZ, desde 1987, pelo ensaio de NIH (SELIGMANN, 1966). As vacinas de uso animal inativadas tiveram sua potência avaliada pelo “teste de Habel” até 2003 no Brasil (HABEL, 1940), seguindo as recomendações da OMS, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) adotou também o ensaio de potência NIH para estas vacinas.

No “teste de Habel”, camundongos de quatro a seis semanas recebem seis inoculações IP de 0,25 mL de vacina contendo 0,5 % de tecido por um período de 12 dias. No 14^o, dia o desafio é realizado com vírus fixo – “Challenge Vírus Standard” (CVS) titulando-se por via i.c. em paralelo nos animais vacinados e controle. O título letal de vírus desafio deve ser reduzido pelo menos 1.000 vezes nos animais vacinados (ou seja uma diferença de três logaritmos entre o título viral nos animais vacinados e controle) para a vacina atingir o “título mínimo necessário”.

No ensaio de potência NIH grupos de camundongos de quatro semanas de idade recebem duas doses de 0,5 mL de vacina sob teste por via IP com intervalo de uma semana. Diluições de vacina são selecionadas de forma que abranjam a dose protetora 50%. Os camundongos são desafiados 14 dias após a primeira imunização com uma dose de 10 a 50 DL₅₀ de vírus CVS por via i.c.. Duas semanas após o desafio, a dose efetiva da vacina teste que protege 50% dos camundongos pode ser calculada (DE₅₀). A DE₅₀ de uma vacina teste é dividida pela DE₅₀ de uma vacina de referência para obter sua potência relativa.

O Comitê de Padronização Biológica da OMS preparou um padrão internacional de vacina contra Raiva para ser usado como referência pelos produtores de vacina de diferentes países. A preparação de referência consistia de uma vacina de célula diplóide humana inativada pela Beta-propiolactona e liofilizada. A OMS encorajou a todos os fabricantes a comparar as vacinas contra Raiva ao padrão internacional pelo ensaio de potência NIH. Tais vacinas apresentam um título expresso em UI/mL, que será multiplicado pela valor da relação obtida entre a DE₅₀ da vacina teste sobre a DE₅₀ da vacina de referência obtendo-se assim o título em UI/mL da vacina em teste.

No Brasil, os requerimentos mínimos de potência adotados são 1,0 UI/mL para a vacina Fuenzalida & Palácios e de 2,5 UI/dose para as vacinas produzidas em cultivo celular (Farmacopéia Brasileira, 2004). No Quadro 8 podemos ver as recomendações da OMS para os diferentes tipos de vacinas. No Brasil os títulos para VCCL foram progressivamente aumentados de 0,3 a 0,6 e depois a 1,0 UI/mL seguindo as mudanças nas recomendações da OMS.

QUADRO 8 - Requerimento mínimo de potência, sugerido pela Organização Mundial de Saúde, para os diferentes tipos de vacinas.

Tipos de Vacinas	Requerimento de Potência	No. de Doses
Tecido Nervoso Animais Adultos	0,3 UI/dose	14
VRH ¹ , VCCL ²	1,3 UI/dose	9 a 10
VCDH ³ , VPEG ⁴ , VPCV ⁵	2,5 UI/dose	5

(1) Vacina de rim de hamster

(2) Vacina Cérebro de Camundongos Lactentes

(3) Vacina de células diplóides humanas

(4) Vacina purificada de células de embrião de galinha

(5) Vacina purificada de células vero.

1.5.4. Detecção de vírus rábico infeccioso residual

A *Ph. Bras.* (2004) preconiza para detecção de vírus rábico infeccioso residual destas vacinas a inoculação da vacina pura em grupos de 20 camundongos de 11 a 15g e de 20 camundongos lactentes de 5 a 10 dias de idade e conseqüente acompanhamento por 21 dias. Os animais que morrem durante o ensaio (end-

point fatal) são submetidos ao teste de IFD. Este ensaio é mais rigoroso do que o preconizado pela OMS (1987).

1.5.5. O conceito dos 3Rs no Controle da Qualidade de imunobiológicos

Como já mencionado, muitas das primeiras gerações de vacinas ainda estão em produção usando técnicas de inativação/detoxificação ou atenuação de um microrganismo virulento. Devido ao modo como as vacinas tradicionais são produzidas, extensos controles da qualidade são necessários e especificações para CQ estão descritas nas monografias específicas para o produto (METZ et al., 2002).

Por vários motivos, maior atenção esta sendo dada ao desenvolvimento de métodos que poderiam substituir (“Replacement”), reduzir (“Reduction”) e refinar (“Refinement”) o uso de animais de laboratório. Estes incluem:

- consciência sobre o uso extensivo e dos níveis substanciais de sofrimento e estresse infligidos aos animais;
- a relevância questionável de alguns modelos animais, como os ensaios de potência da própria vacina contra Raiva e da vacina de pertussis celular que apresentam reprodutibilidade muito baixa;
- o fato que testes animais são demorados e interferem nos tempos de vida limitados das vacinas.;
- novos desenvolvimentos e estratégias na produção de vacinas como padronização de processos, a introdução das boas práticas de produção (GMP - “Good Manufacturing Practices”) e a Garantia da Qualidade e Controles em Processo, que fazem o controle da qualidade extensivo menos relevante e até supérfluo.

Revisões extensivas dos desenvolvimentos dos 3Rs tem sido publicadas (HENDRIKSEN, 1988; WEISSER & HECHLER, 1997; HALDER, 2001). Um resumo de alguns dos avanços é apresentado no Quadro 9.

QUADRO 9. Resumo dos maiores desenvolvimentos em 3Rs no controle da qualidade de vacinas.

Vacina	Teste Animal	Alternativa 3Rs
Toxóides	Teste de potência baseado em procedimento de desafio	Teste de potência baseado em sorologia
Todas	Teste de toxicidade anormal	Removido das especificações ¹
Hepatitis B	Teste de potência em camundongos	Método <i>in vitro</i> (EIE ²)
Pólio (viva)	Neuro-virulência em macacos	Ensaio MAPREC ³ e teste em camundongos transgênicos
Vacinas relevantes	Procedimentos de desafio Letal	Uso dos “end-point” humanitários

(1) Removido das monografias das Farmacopéias Européia e Brasileira, porém, continua especificado por outros órgãos reguladores

(2) Ensaio Imuno Enzimático

(3) Mutant analysis by PCR and Restriction Enzyme Cleavage

1.6. RELEVÂNCIA DESTE TRABALHO

Testes em animais desempenham um papel crucial em pesquisa e desenvolvimento e no controle da qualidade de vacinas de uso humano. Ensaios de controle da qualidade de vacinas, *in vivo* assim como *in vitro*, são importantes estágios no estudo das vacinas, durante a pesquisa e desenvolvimento, durante a produção de rotina e após a produção, na liberação de lotes.

Em 1959 o livro “The Principles of Humane Experimental Technique” foi publicado por RUSSEL & BURCH (1959). Embora o livro só tenha obtido reconhecimento na década de 1970, serviu como pedra fundamental na experimentação animal que deu origem ao conceito dos 3Rs (*Reduction, Refinement and Replacement*). Pode ser definido como: *Replacement* (substituição), substituir animais vivos conscientes por material insensível; *Reduction* (redução), reduzir o número de animais para obter uma dada quantidade de precisão; *Refinement* (refinamento) evitar procedimentos desumanos em animais de laboratório (METZ et al., 2002).

Os 3Rs de RUSSELL & BURCH são uma meta de valor reconhecido para o bem estar animal (ARK et al., 2000). Além de eticamente questionáveis, os ensaios *in vivo* apresentam várias desvantagens (i.e. são dispendiosos, pouco exatos e de longa duração).

Russell & Burch acreditaram que seguir o princípio dos 3Rs poderia resultar em um tratamento mais humanitário e ético dos animais. Estes conceitos estão sendo adotados por um grande número de cientistas e organizações protetoras de animais e estão sendo inseridos em leis de vários países.

Nas décadas recentes, o uso do princípio dos 3Rs também tem sido reconhecido pelos órgãos reguladores (como a *Ph. Eur.* e FDA) e várias autoridades internacionais, tendo sido incorporado em monografias e normas. Vários testes com relevância questionável foram removidos das monografias da *Ph. Eur.* (como o teste de toxicidade inespecífica e testes de agentes infecciosos adventícios para vacinas de carnívoros) ou são realizados apenas durante a produção. Redução do número de animais usados pode ser atingida pela introdução de testes de diluição única. Um grande número de testes imunológicos foi desenvolvido, que podem completamente ou parcialmente, substituir o uso de animais para os ensaios de potência (e.g. ToBI e EIE para ensaio de potência de vacina veterinária e humana contra tétano; EIE para potência de vacinas contra erisipela).

A aceitação pela autoridade reguladora de métodos alternativos validados continua sendo uma etapa crítica. Em particular, o período entre validação satisfatória e a implementação, em geral, é longo demais. Razões para isto poderiam ser: a) o processo lento para concordância multinacional rever as monografias de farmacopéias e normas e b) a demorada e onerosa produção de materiais de referência (antígenos, soros etc) para os novos sistemas (HALDER, 2001).

Embora a sociedade aceite que animais sejam usados para estes propósitos, há um forte incentivo público para que esta situação só seja aceita em casos onde não existam métodos alternativos. Além disto, há forte pressão para a combinação entre segurança e eficácia de produtos e o bem estar animal (DOBBELAER, 2000).

No Brasil, em 2008, após 12 anos de tramitação foi promulgada a Lei 11.794, proposta pelo Sanitarista Sérgio Arouca, que trata do uso de animais na experimentação animal. A Lei trás consistente regulamentação e normatização Federal para o uso dos animais.

Caberá à comunidade científica dar forma ao estabelecido na lei e por conseqüência gerar um ambiente propício para o bem estar animal. Um passo simples e fundamental para que a aplicabilidade da Lei seja real, é que todas as Instituições de Ensino e Pesquisa constituam suas comissões de ética.

Dentre os diversos pontos importantes previstos na Lei destacam-se os seguintes:

- a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, como órgão normatizador, credenciador, supervisor e controlador das atividades de ensino e de pesquisa com animais, inclusive monitorando e avaliando a introdução de métodos alternativos que substituam os animais em ensino e pesquisa;
- a criação das Comissões de Ética no Uso de Animais - CEUAS, que serão obrigatórias em todas as instituições que pratiquem a experimentação animal e
- a definição das Penalidades aplicadas às instituições ou aos profissionais pelo emprego indevido das normas ou mesmo dos próprios animais.

Na FIOCRUZ, a CEUA está encarregada de emitir pareceres quanto aos aspectos éticos de todos os procedimentos envolvendo animais, considerando a relevância do propósito científico e o impacto de tais atividades sobre a preservação da vida, o bem estar e a proteção dos animais.

O uso de animais de laboratório foi fundamental no desenvolvimento e na garantia da qualidade dos produtos imunobiológicos para Raiva, no entanto, atualmente, com o avançado estágio de desenvolvimento tecnológico das técnicas de laboratório e da consciência ética, esforços devem ser dirigidos para a racionalização no uso destes animais no controle da qualidade daqueles produtos. A proposta desta pesquisa é aplicar na prática o conceito dos 3Rs de RUSSELL & BURCH (1959) nos ensaios realizados para a liberação de lotes de imunobiológicos para Raiva de uso humano preconizados pela *Ph. Bras.*

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Aplicar o conceito dos 3Rs nos ensaios realizados para controle da qualidade de imunobiológicos para Raiva no INCQS.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar e validar uma técnica *in vitro* baseada na RFFIT, como alternativa ao ensaio de potência *in vivo* para soro anti-rábico.
- Avaliar, retrospectivamente, uma redução no número de animais no ensaio de potência NIH para vacina contra Raiva.
- Avaliar os efeitos de uma Redução no número de animais, de um Refinamento na execução e a sensibilidade de uma técnica *in vitro* para detecção de vírus rábico infeccioso residual em vacinas contra Raiva.

3. RESULTADOS

Optamos por apresentar os resultados obtidos na tese no formato de coletânea de artigos científicos, com a apresentação de três manuscritos. Dois submetidos e um não submetido. O Manuscrito 1 foi publicado em 2008, o Manuscrito 2 em 2009. O terceiro manuscrito será submetido futuramente. Os materiais e métodos estão descritos em cada manuscrito.

3.1 - MANUSCRITO 1

Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study (Journal of Virological Methods, 2008, 154, 7-13, doi:10.1016/j.jviromet.2008.09.010). Disponível no Anexo 1 na formatação original.

Aceito em 15/09/2008.

Ms. Ref. No.: VIRMET-D-08-00242R2

Title: Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study
Journal of Virological Methods

Dear Wlamir,

I am pleased to confirm that your paper "Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study" has been accepted for publication in Journal of Virological Methods.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

A. Zuckerman
Editor-in-Chief
Journal of Virological Methods



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

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

Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study

Wlamir Corrêa de Moura^{a,b,*}, Neuza Maria Frazatti Gallina^c, Regina Maria Mourão Fuches^c, Phyllis Catharina Romijn^d, José Paulo Gagliardi Leite^e

^a Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365 – Rio de Janeiro, CEP 21045-900, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

^c Instituto Butantan – Av. Vital Brazil, 1500 São Paulo, Brazil

^d Secretaria Estadual de Saúde, Rio de Janeiro. Rua México, 128 - 413 Rio de Janeiro, Brazil

^e Laboratório de Virologia Comparada, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365 – Pavilhão Hélio e Peggy Pereira, Rio de Janeiro, Brazil

ABSTRACT

A rabies virus neutralization potency test (VNPT), adapted to microplates from the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for rabies therapeutic immunoglobulin potency evaluation, was standardized and validated in a two-center study in Brazil. The two institutes involved in the study were: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Fundação Oswaldo Cruz) and Instituto Butantan.

Two equine rabies immunoglobulin samples, all diluted to 1 IU/ml, were tested against the WHO 2nd Rabies Human Ig International Standard. Four dilutions of the samples and standards were tested with the VNPT.

The potency of the samples was calculated in IU/ml using the probit method; linearity, accuracy, repeatability (intra-assay variation), intermediate precision (inter-assay variation) and reproducibility (inter-laboratory variation) were assessed to evaluate the reliability of the VNPT. Laboratories were arbitrarily coded as Laboratory A and Laboratory B.

The following results were obtained with the International Standard: (a) linearity, the overall coefficient of correlation of the dose–response curve was -0.97 ; (b) accuracy, % error of -0.70 (IU/ml); (c) repeatability, 17.06% (Laboratory A) and 11.61% (Laboratory B); (d) intermediate precision, 16.99% (Laboratory A) and 22.05% (Laboratory B); (e) reproducibility, 14.5%. The final conclusion was that VNPT presents satisfactory linearity, accuracy, repeatability, intermediate precision and reproducibility and is a reliable and suitable method by which to evaluate rabies immunoglobulin potency.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Article history:

Received 28 May 2008

Received in revised form 4 September 2008

Accepted 15 September 2008

Available online 30 October 2008

Keywords:

Rabies

Virus neutralization test

RFFIT

Validation

1. Introduction

Rabies is a vaccine-preventable disease; however, this disease is still a significant public health problem in many Asian and African countries (WHO, 2007a), even though safe and effective vaccines exist for both human and veterinary use. Post-exposure treatment, including specific rabies immune globulin when necessary, is recommended for all cases of potential infection (WHO, 2002).

There are three classes of rabies immunoglobulins (RIG) that are available currently for passive immunization: (a) human IgGs (HRIG), (b) equine IgGs (ERIG) and (c) highly purified F(ab')₂ produced from ERIG (WHO, 2004). All three must be used according to WHO recommendations (WHO, 2007b). In Brazil, mainly the highly purified F(ab')₂ class from ERIG is used.

The measurement and standardization of the potency is the most critical of all quality control tests of RIG, first at the bulk stage and then in the final vial (Cabasso, 1991).

Virus neutralization assays are used extensively for antibody detection of rabies, and a great diversity of protocols has been described. The residual virus infectivity in these tests is determined by inoculating mice (Fitzgerald, 1996) or cell cultures (Smith et al., 1973, 1996; Trimarchi et al., 1996; Zalan et al., 1979).

* Corresponding author at: Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365 – Rio de Janeiro, CEP 21045-900, RJ, Brazil. Tel.: +55 21 38655230; fax: +55 21 22900915.
E-mail address: wlamir.corrêa@incqs.fiocruz.br (W.C. de Moura).

The mouse virus neutralization assay (MVNA) was the first to be developed (Atanasiu, 1996; Webster and Dawson, 1935), and due to its traditional and widespread use, it has been adopted as the standard technique against which other tests are evaluated (Smith, 1991).

Russell and Burch's concept of 3Rs (replacement, reduction and refinement) in laboratory animal testing is a recognized worthwhile goal for animal welfare (Ark et al., 2000). It can be defined as: replacement, to substitute insentient material for conscious living higher animals; reduction, to reduce the numbers of animals used to obtain information of given amount and precision; refinement, to avoid unnecessary inhumane procedures applied to laboratory animals (for review see Ref. Metz et al., 2002).

Since the precision of in vivo assays is limited (Smith, 1991), bioassays based on in vitro responses of stable cell lines are commonly used. They can provide a biologically relevant method of testing the product, and they are less variable, less expensive and less labor-intensive than in vivo assays (Robinson, 2003).

A study undertaken by the International Laboratory for Biological Standards at the Serum Institute in Copenhagen, Denmark showed that the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) is the best technique for evaluating the potency of RIG (WHO, 1998). The United States Pharmacopeia (2007) and The European Pharmacopoeia (EP) (Council of Europe, 2005b) adopted RFFIT as the official Quality Control potency test for HRIG and ERIG because it is cheaper, faster, more accurate and more reproducible than in vivo tests. RFFIT was developed originally by Smith et al. (1973), who used Lab-Tek chambers. Zalan et al. (1979) were the first to adapt the technique to 96-well microplates.

The Brazilian National Control Laboratory, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, a Fundação Oswaldo Cruz unit, is responsible for batch release tests of all the immunobiologicals used in Brazil, including HRIG and ERIG. The mouse virus neutralization assay is the technique described in the Brazilian Pharmacopoeia (Farmacopéia Brasileira, 2004). There are two national producers of highly purified F(ab')₂ from ERIG: Instituto Butantan, which is responsible for 70% of all ERIG used in the country, and Instituto Vital Brazil, which is responsible for the other 30%.

An in vitro rabies virus neutralization potency test (VNPT) that uses BHK-21 cells in 96-well plates from the RFFIT method described in the EP HRIG monograph (Council of Europe, 2005b) was standardized between the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde and the Instituto Butantan, the only laboratories that perform the in vitro test in Brazil, as an alternative to the in vivo assay for potency of therapeutic RIG. Before this standardization, each laboratory had its own protocol for RFFIT that was adapted to 96-well plates. There were slight differences between the different protocols, so the unique standardized protocol that was developed led to a better agreement of results. As a pharmacopoeial method, RFFIT does not require revalidation; but, with the adaptation to microplates it was necessary to demonstrate the method's precision and ability to achieve the suitable detection level.

Validation is the process by which the reliability and relevance of a test method are evaluated for the purpose of supporting a specific use (NIEHS, 1997; Frazier, 1990). The relevance of RFFIT has already been demonstrated and is accepted due to its very good correlation with the MVNA (Guillemin et al., 1981a, 1981b; Louie et al., 1975; Smith, 1991).

A two-center study was performed by the Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde and the Instituto Butantan. The primary goal was to establish performance specifications and validate the assay by demonstrating its reliability (variability or imprecision), linearity, accuracy, repeatability (intra-assay

Table 1
Assays performed in each Laboratory for each sample.

Sample	Laboratory A	Laboratory B	Overall no.
IS ^a			
Replicate no.	5	4	
Assay no.	6	5	
Result no.	30	20	50
BR011			
Replicate no.	5 and 2	5	
Assay no.	5	4	
Result no.	22	20	42
0505085			
Replicate no.	5 and 10	4	
Assay no.	4	4	
Result no.	25	16	41

^a International Standard.

variation), intermediate precision (inter-assay variation) and reproducibility (inter-laboratory variation).

2. Materials and methods

A study protocol was established in accordance with the WHO Good Manufacture Practice guide for analytical assay validations (WHO, 1997). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde coordinated the study, and the laboratories were arbitrarily coded as Laboratory A and Laboratory B.

2.1. Study design and assay performance specifications

- (a) Two sera were tested against the WHO 2nd HRIG International Standard (IS) obtained from the National Institute of Biological Standardization and Control (NIBSC, UK): a Brazilian Candidate National Standard ERIG (BR011) and a commercial

Table 2
Parameters evaluated to access the reliability of the VNPT according to WHO (1997) protocol.

Parameters	Assessment approach	References
Linearity	(a) Coefficient of correlation of IS dose-response curves (b) Coefficient of correlation of IS ED50 × Virus Dose (c) In all assays, as a validity criterion	(Plikaytis et al., 2000; WHO, 1997; Council of Europe, 2005a)
Accuracy	(a) % Error for IU/ml of IS	(Plikaytis et al., 2000; WHO, 1997)
Repeatability (intra-assay variation)	(a) % CV of ED50 of IS (b) % CV of estimated sample potencies: BR011 and 0505085	(Bland, 2005; Bland and Altman, 1996; Bland and Kerry, 1998; WHO, 1997)
Intermediate precision (inter-assay variation)	(a) % CV of ED50 of IS (b) % CV of estimated sample potencies: BR011 and 0505085	(Same as repeatability)
Reproducibility (inter-laboratory variation)	(a) % CV of ED50 of IS (b) % CV of estimated sample potencies: BR011 and 0505085	(Same as repeatability)

% CV, coefficient of variation percent; ED50, effective dose 50%; IS, International Standard.

Table 3
Data used for % CV calculation to assess repeatability, intermediate precision and reproducibility.

	Repeatability		Intermediate precision	Reproducibility
	Intra-assay	Overall intra-assay	Inter-assay	Inter-laboratory
S.D. ^a as SR ^b of	Variance per day, per Laboratory	Mean of variances of assays per day, per Laboratory	Overall results weighted variance per Laboratory	Overall results weighted variance (both Laboratories)
GM ^c	Laboratory results per day	Overall per Laboratory results	Overall per Laboratory results	Overall results (both Laboratories)

References: Bland (2005), Bland and Altman (1996), Bland and Kerry (1998) and WHO (1997).

^a Standard deviation.

^b Square root.

^c Geometric mean.

- ERIG (batch number 0505085), both produced by the Instituto Butantan.
- (b) The challenge virus strain used was CVS-11 (Pasteur Institute, Paris, France), which was produced in BHK-21 cells and provided by the Instituto de Tecnologia do Paraná (Paraná, Brazil). Each laboratory used its own working virus batch.
- (c) Controls were used in every plate: negative serum, virus titration and cell culture controls.
- (d) Each laboratory tested four twofold dilutions of the three sera simultaneously on at least four different days with at least four replicates (Table 1).
- (e) The culture medium used was Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) supplemented with 5 and 2.5% fetal bovine serum for cell growth and the assay procedure, respectively.
- (f) Replicates were tested in the same plate.
- (g) Sera were diluted to 1 IU/ml. Each sample was tested in four twofold dilutions to obtain the following dilutions after mixing with the working virus dilution:
- BR011: pre-diluted to 1:400; then, the sample was further diluted from 1:16 to 1:128 (these represent real dilutions of 1:6400 to 1:51,200)
 - ERIG 0505085: pre-diluted to 1:200 and then diluted from 1:16 to 1:128 (these represent real dilutions of 1:3200 to 1:25,600)
 - IS with 30 IU/ampoule: pre-diluted to 1:30 and then diluted from 1:16 to 1:128 (these represent real dilutions of 1:480 to 1:3840).
- (h) The CVS working dilution, containing 200 initial CCID50/50 µl, was added to each well except for the two cell control wells. The final CVS concentration was 100 final CCID50/50 µl after mixing with sera dilutions.
- (i) For the virus neutralization, plates were incubated between 36.5 and 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂ for 90 min. Afterwards, 50 µl of BHK-21 cells (ATCC, Rockville, USA) suspended in EMEM-2.5 (at a concentration of 7 × 10⁵ to 8 × 10⁵ cells per 50 µl) was added to each well, and the plates with

infected cells were incubated for 22 h under the same incubation conditions.

- (j) After the medium was discarded, the wells were rinsed once with PBS and then fixed in cold (–20 °C) acetone (80%, v/v) for 15 min at room temperature.
- (k) Plates were left to dry at room temperature for 10 min, stained with fluorescein-conjugated rabies antiserum (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France–cat. # 72114), incubated for 30 min at 37 °C and then rinsed twice with PBS.
- (l) The plates were read (eight fields in each well, as recommended by Zalan et al., 1979) on an inverted fluorescence microscope at 200× magnification. The results are expressed as the ratio of fluorescent fields per total fields read.

2.1.1. Statistical analyses

The raw data from Laboratories A and B were analyzed by INQCS, and the potency results (IU/ml) and/or IS ED50 were calculated using a personal computer spreadsheet, developed and validated following the probit method of Council of Europe, 2005a, for each replicate in each assay of each preparation within each laboratory. The Geometric Mean (GM) and S.D. (from square root of variances) were determined in order to calculate the % CV and the root mean square % CV for the different parameters evaluated (Tables 2 and 3) (Bland, 2005; Bland and Altman, 1996; Bland and Kerry, 1998; WHO, 1997). When different numbers of replicates were used, a weighted % CV was calculated.

Linearity was evaluated using Pearson's coefficient of correlation and used as a criterion for assay validity. The % error (Plikaytis et al., 2000) was calculated to assess the accuracy.

2.2. Assay validity parameters

According to the Council of Europe, 2005b criteria, tests cannot be considered valid unless:

- With the working virus titration, 50 µl of the suspension contains between 30 and 300 CCID50
- The dose–response curve has a significant slope and no significant deviations from linearity or parallelism.

3. Results

3.1. Linearity

Three approaches were used to evaluate linearity.

3.1.1. The dose–response curve of the IS% of rabies virus fluorescent fields inhibition

To obtain a normal distribution, a logarithmic base 10 transformation was performed on the mean % of rabies virus fluorescent

Table 4
Analyses of linearity using the mean % of fluorescent fields inhibited per dilution of the WHO Human Rabies Ig 2nd International Standard diluted to contain 1 IU/ml.

Dilution	% of response ^a		
	Laboratory A, n=30	Laboratory B, n=20	Overall n=50
1/16	100 (2.00)	100 (2.00)	100 (2.00)
1/32	63 (1.80)	84 (1.92)	73 (1.87)
1/64	3 (0.48)	8 (0.90)	6 (0.74)
1/128 ^b	0 (no log)	0 (no log)	0 (no log)
Pearson	–1.0	–0.96	–0.97

(.) = log10.

^a Mean of the % of virus neutralization per dose.

^b Not used in the calculation.

Table 5
Correlation between WHO Human Rabies Ig 2nd International Standard ED50 and rabies virus titer.

Institute	Assay no.	ED50 ^a		CCID50/50 µl	
		Reciprocal	Log10	Titer	Log10
Laboratory A	1	29.96	1.47	155.41	2.19
	2	40.76	1.61	87.33	1.94
	3	41.63	1.62	64.12	1.81
	4	32.43	1.51	169.50	2.23
	5	34.60	1.54	125.89	2.10
	6	33.40	1.52	166.81	2.22
Laboratory B	1	56.83	1.75	42.61	1.63
	2	34.60	1.54	84.19	1.93
	3	41.06	1.61	106.18	2.03
	4	42.60	1.63	87.98	1.94
Overall GM ^b		38.16	1.57	100.37	1.99

^a Effective dose 50%.

^b Geometric mean.

fields inhibited by the IS per dilution (Table 4); then, this data was plotted as the measurement response (y-axis) against the dilution concentration (x-axis). The Pearson correlation was obtained for Laboratory A (−1.0) and Laboratory B (−0.96), and the overall correlation was −0.97. This data demonstrates a very good inverse correlation and shows that the method produces a satisfactory linear response.

3.1.2. The correlation between IS ED50 and rabies virus dose (expressed as the CCID50 titer)

To obtain a normal distribution, a logarithmic base 10 transformation was performed on the ED50 of the IS results (Table 5); then, the mean ED50 for the IS obtained in each assay was tested against the CCID50 titer of the CVS obtained per assay. The Pearson correlation was obtained for Laboratory A (−0.92) and Laboratory B (−0.81), and the overall correlation was −0.90, which is significant at $p = 0.01$. Fig. 1 presents the spread graphic with the trendline and

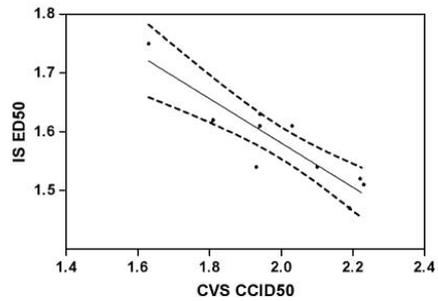


Fig. 1. Spread graphic, showing the trend line and the 95% confidence intervals, between the logarithms of the WHO Human Rabies Ig 2nd International Standard ED50 and the Challenge Virus CCID50.

95% confidence intervals. This data shows a good inverse correlation between ED50 and CCID50 titer and that the method produces a satisfactory linear response.

3.1.3. An assay validity parameter

A routine to evaluate deviations from linearity was included in the probit spreadsheet, as described in the EP (Council of Europe, 2005a), that was used as a parameter for assay validity; our data showed no deviation from linearity in any of the tests performed in the study.

3.2. Accuracy

Since there are no pure standards in biological samples, often the accuracy cannot truly be assessed with a direct comparison to a known standard. As such, we took a practical approach to evaluate the accuracy of our results.

Table 6

Individual assay and pooled geometric means of potency values expressed in IU/ml per sample (against WHO Human Rabies Ig 2nd International Standard) with 95% confidence interval.

Sample	Laboratory A			Laboratory B		Overall GM
	Assay	GM ^a	Range	GM	Range	
IS ^b	1	30.37	(27.86–36.79)	30.10	(26.97–33.79)	–
	2	30.27	(26.08–38.23)	30.20	(24.79–34.75)	–
	3	30.44	(23.43–37.43)	30.04	(29.28–33.06)	–
	4	30.19	(25.73–33.98)	30.30	(26.59–38.21)	–
	5	30.30	(27.02–39.23)	c	–	–
	6	30.05	(26.78–30.86)	c	–	–
GM ^a		30.27	(28.52–31.56) ^d	30.16	(28.57–31.50) ^d	30.21 (28.97–31.07) ^d
BR011	1	481.54	(364.05–628.96)	716.23	(640.45–805.77)	–
	2	310.85	(253.58–364.17)	699.40	(620.15–883.98)	–
	3	488.94	(448.12–557.66)	609.16	(448.56–726.46)	–
	4	570.58	(553.69–587.97)	704.62	(636.37–741.76)	–
	5	604.84	(487.93–650.40)	c	–	–
GM		487.88	(414.15–528.59) ^d	680.95	(638.01–726.78) ^d	559.43 (511.19–612.22) ^d
0505085	1	259.66	(228.16–293.40)	382.22	(227.66–320.52)	–
	2	173.64	(168.02–202.77)	308.05	(264.31–390.88)	–
	3	325.78	(266.75–342.48)	321.39	(277.06–392.08)	–
	4	182.54	(142.11–237.53)	379.39	(351.62–426.49)	–
GM		217.74	(193.57–244.92) ^d	320.95	(292.14–352.59) ^d	253.34 (229.60–279.52) ^d

^a Geometric mean.

^b International Standard.

^c Not done.

^d 95% Confidence interval.

Table 7

Individual assays and pooled geometric means of ED50 values expressed as a reciprocal of dilution for WHO Human Rabies Ig 2nd International Standard diluted to 1 IU/ml, with 95% confidence interval.

Sample	Assay	Laboratory A		Laboratory B		Overall GM
		GM	Range	GM	Range	
IS ^a	1	29.16	(23.06–36.74)	56.83	(51.09–64.00)	–
	2	40.76	(35.44–51.94)	34.60	(28.59–40.08)	–
	3	41.63	(32.00–51.94)	41.06	(40.08–45.25)	–
	4	32.43	(27.82–36.74)	42.60	(37.75–54.26)	–
	5	34.60	(31.17–45.25)	^b	–	–
	6	33.40	(29.81–34.36)	^b	–	–
GM ^c		35.21	(32.89–37.69) ^d	43.07	(39.03–47.52) ^e	38.16 (35.89–40.58) ^f

^a International Standard.
^b Not done.
^c Geometric mean.
^d 95% Confidence interval.

3.2.1. Percent error of IS IU/ml

Since there were no significant differences between the ED50 results of Laboratories A and B, the potency in IU/ml (Table 6) was obtained for each IS replicate (against the ED50 mean per test).

The IS individual and overall % error of Laboratories A and B were determined as described by Plikaytis et al. (2000), which measures the degree of error between a laboratory's result and the assigned value.

When the IS IU/ml geometric means were tested with the Student's *t*-test ($t = 2.3$ $P = 0.09$), no significant differences were found (0.06 log₁₀) between Laboratories A ($n = 6$) 30.27 IU/ml and B ($n = 4$) 30.16 IU/ml; the overall GM was 30.21 IU/ml.

The % error calculated for IU/ml values were similar between the two laboratories, with –0.90% for Laboratory A and –0.53% for Laboratory B. An overall % error of –0.70% was achieved.

3.3. Assay variation

The repeatability, intermediate precision and reproducibility of the VNPT were determined as described in Section 2.1.1. The potency and ED50 results for Laboratories A and B are shown in Tables 6 and 7. In Table 8, a summary of the assay variation analysis is shown.

3.3.1. Repeatability

In Laboratories A and B, repeatability was determined by the variation in the IS ED50 and in the potency results of the ERIGs BR011 and 0505085 (IU/ml).

Table 8

Assay variation-% CVs found in the study for evaluating repeatability, intermediate precision and reproducibility of VNPT.

Sample	% CV ^a		
	IS ^b (ED50 ^c)	BR011 (UI/ml)	050585 (UI/ml)
Laboratory A			
Repeatability	17.06	11.00	11.37
(Range)	(6.09–18.89)	(4.25–20.25)	(8.83–13.39)
IP ^d	16.99	19.77	12.35
Laboratory B			
Repeatability	11.61	12.78	15.18
(Range)	(5.63–16.41)	(7.21–18.11)	(9.59–19.73)
IP	22.05	13.20	17.67
Reproducibility	15.83	13.73	13.97

^a Coefficient of variation.
^b International Standard.
^c Effective dose 50%.
^d Intermediate precision.

3.3.1.1. Determined by the variation in the IS ED50 results. In Laboratory A, the intra-assay % CV for IS ED50 ($n = 30$) ranged from 6.09 to 18.89% (Table 6); the overall % CV was 17.06%. In Laboratory B ($n = 20$), it ranged from 5.63 to 16.41% (Table 8), and the overall % CV was 11.61%.

3.3.1.2. Determined by the variation in the potency results (IU/ml) of ERIGs BR011 and 0505085. In Laboratory A, for ERIG BR011, the intra-assay % CV ($n = 22$) ranged from 4.25 to 20.25% (Table 8), and the overall intra-assay % CV was 11.00%. In Laboratory B ($n = 20$), it ranged from 7.12 to 18.11% (Table 8), and the overall intra-assay % CV of the replicates was 12.78%.

In Laboratory A, for ERIG 0505085, the intra-assay % CV ($n = 25$) ranged from 8.83% to 13.39% (Table 8), and the overall intra-assay % CV was 11.37%. In Laboratory B ($n = 16$), it ranged from 9.59 to 19.73% (Table 8), and the overall intra-assay % CV was 15.18%.

3.3.2. Intermediate precision

3.3.2.1. Determined by the variation in IS ED50. In Laboratory A ($n = 6$), the inter-assay % CV in the IS ED50 was 16.99%, and in Laboratory B ($n = 5$), it was 22.05% (Table 8).

3.3.2.2. Determined by the variation in the potency results (IU/ml) of ERIGs BR011 and 0505085. In Laboratory A ($n = 5$), for BR011, the inter-assay % CV was 19.77%, and in Laboratory B ($n = 4$), it was 13.20% (Table 8). In Laboratory A ($n = 4$), for ERIG 0505085, the inter-assay % CV was 12.35%, and in Laboratory B ($n = 4$), it was 17.67% (Table 8).

3.4. Reproducibility

3.4.1. Determined by the variation in the IS ED50

The weighted inter-laboratory % CV was 15.51% when calculated using the data obtained with the IS ED50 in the two laboratories ($n = 50$).

3.4.2. Determined by the variation in the potency results for ERIG 0505085 and BR011

The weighted % CV calculated with all the potency results in IU/ml obtained in the two laboratories with BR011 ($n = 42$) was 12.85% and with 0505085 ($n = 41$) was 16.26%.

4. Discussion

Quality Assurance Systems, such as GMP and ISO/IEC, require the use of appropriately validated analytical procedures. While pharmacopoeial methods do not require revalidation, for batch release

of medical products, certain procedures should be conducted to ensure that methods are applicable at the time of use. It may also be necessary to confirm the precision of the method or the ability to achieve the detection levels of the validated method (Australian Government, 2006). Validation of a test method is the process by which the reliability, an objective measure of a method's intra- and inter-laboratory reproducibility (Balls et al., 1990), and relevance are evaluated for the purpose of supporting a specific use (NIEHS, 1997; Frazier, 1990). A test method is considered validated when its performance characteristics, advantages and limitations have been adequately determined for a specific purpose (Balls et al., 1990). There is no optimal or minimum level of reproducibility or association with the event of interest that must be reached for a successful validation. The levels of reliability and relevance that are needed will depend on the conditions under which the test will be used and the purposes to which its results will be applied (Robinson, 2003). To assess the reliability of a binding type test, such as EIA, Ark et al. (2000), and Jacobson (1998), adopted a variation of 20% or less as good CV % for repeatability. For WHO (1997), binding assays typically have a 5 to 20% variability, while cell and whole animal assays may have a variability above 50%. The present manuscript compares the results obtained in a two-center study performed by two Brazilian Laboratories (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde and Instituto Butantan) for the validation of an alternative RIG in vitro test for potency evaluation. It demonstrated that the VNPT presents a satisfactory variation according to the standards adopted by WHO (1997), Jacobson (1998) and Ark et al. (2000). To verify the reliability of the VNPT, the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde revised the ED50 control charts of the ERIG National Standard that are currently in use and found a % CV of 78% ($n=34$) in MVNA and 15.05% ($n=20$) in VNPT (unpublished data). Also, the overall GM obtained in this study for the IS ED50 reciprocal of dilution agrees well with those obtained by Fitzgerald and Rastogi (1985) and Cliquet et al. (1998), who used the same IS.

5. Conclusion

The virus neutralization potency test for rabies in BHK-21 cells presents satisfactory linearity, accuracy, repeatability, intermediate precision and reproducibility; it is a reliable, rapid and convenient method to evaluate the potency of ERIG and HRIG.

Acknowledgements

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; Dr. Hisako Gondo Higashi, Director of the Division of Technological Developing and Production, from Instituto Butantan for the production and supply of the ERIG Candidate Standard; Dr. Angela Aparecida Preto, from the Instituto de Tecnologia do Paraná, for providing the virus sample; Dr. Eleonora Meira de Vasconcelos for English revision; Coordination of Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; Instituto Oswaldo Cruz (IOC) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

References

- Ark, A., Kappelle, I.S., Ölander, R.M., Enssle, K., Jadhav, S., Donk, H., Hendriksen, C.F.M., 2000. The Pertussis Serological Potency test collaborative study to evaluate replacement of the mouse protection test. *Biologicals* 28, 105–118.
- Atanasiu, P., 1996. Quantitative assay and potency test of rabies serum and immunoglobulin. In: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*. WHO, Geneva, pp. 314–318.
- Australian Government, March, 2006. Therapeutic Goods Administration, Finished Product (Medicine) Analytical Procedure Validation for Complementary Medicines. Available at: <http://www.tga.gov.au/cm/finishval.pdf>.
- Balls, M., Botham, P., Cordier, A., Fumero, S., Kayser, D., Köefer, H., Koundakjian, P., Lindquist, N.G., Meyer, O., Pioda, L., Reinhardt, C., Rozemond, H., Smyrniotis, T., Spielmann, H., Van Looy, H., van der Venne, M.-T., Walum, E., 1990. Report and recommendations of an international workshop on promotion of the regulatory acceptance of validated non-animal toxicity test procedures. *ATLA* 18, 339–344.
- Bland, M.J., 2005. How should I calculate a within-subject coefficient of variation? Available at: <http://www-users.york.ac.uk/~mb55/meas/cv.htm>.
- Bland, M.J., Altman, D.G., 1996. Statistics notes: measurement error proportional to the mean. *BMJ* 313 (July), 106.
- Bland, M.J., Kerry, S.M., 1998. Statistics notes: weighted comparison of means. *BMJ* 316, 129.
- Cabasso, V.J., 1991. Local wound treatment and passive immunization. In: Baer, G.M. (Ed.), *The Natural History of Rabies*, 2nd ed. CRC, Florida, pp. 551–570.
- Cliquet, F., Aubert, M., Saugné, L., 1998. Development of a fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J. Immunol. Methods* 212, 79–87.
- Council of Europe, 2005a. Assays depending upon quantal responses. (Chapter - General texts - 4). In: *The European Pharmacopoeia*, 5th ed. Strasbourg, France, pp. 484–486.
- Council of Europe, 2005b. Human rabies immunoglobulin (Monograph No. 0723). In: *The European Pharmacopoeia*, 5th ed. Strasbourg, France, pp. 1750–1751.
- Farmacopéia Brasileira, 2004. Fascículo 5-4a Ed. parte II. Soro Anti-rábico. monografia 109. Atheneu Ed. São Paulo, SP, Brasil.
- Fitzgerald, E.A., Rastogi, S.C., 1985. A collaborative study to establish an International Standard Rabies immunoglobulin of human origin. *J. Biol. Stand.* 13, 327–333.
- Fitzgerald, E.A., 1996. Potency test for anti-rabies serum and immunoglobulin. In: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*. WHO, Geneva, pp. 417–422.
- Frazier, J.M., 1990. Scientific criteria for validation of in vitro toxicity tests. OECD Environment Monograph Number 36. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) 36, pp. 1–62.
- Guillemin, F., Tixier, G., Soulebot, J.P., Chappuis, G., 1981a. Comparison de deux méthodes de titrage des anticorps antirabiques neutralizants. *J. Biol. Stand.* 9, 147–156.
- Guillemin, F., Tixier, G., Soulebot, J.P., Chappuis, G., 1981b. Résultats comparés des anticorps antirabiques per deux méthodes utilisant l'immunofluorescence. *J. Biol. Stand.* 9, 157–160.
- Jacobson, R.H., 1998. Validation of serological assay for diagnosis of infectious diseases. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 17 (2), 469–486.
- Louie, R.E., Dobkin, M.B., Meyer, P., Chin, B., Roby, R.E., Hammar, A.H., Cabasso, V.J., 1975. Measurement of rabies antibody: comparison of the mouse neutralization test with the rapid fluorescent focus inhibition test. *J. Biol. Stand.* 3, 365–368.
- Metz, B., Hendriksen, C.F.M., Jiskoot, W., Kersten, G.F.A., 2002. Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. *Vaccine* 20, 2411–2430.
- NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences), 1997. Validation and regulatory acceptance of toxicological test methods: a report of the ad hoc Inter-agency Coordinating Committee on the validation of alternative methods, NIH Publication No. 97-3981, NIEHS, Research Triangle Park, North Carolina, U.S.A., Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/about_docs/validate.pdf.
- Plikaytis, B.D., Goldblatt, D., Frasch, E., Blondeau, C., Bybel, M.J., Gienbink, G.S., Jonsdottir, I., Käyhty, H., Konradsen, H.B., Madore, D.V., Nahm, M.H., Schulman, C.A., Holder, P.F., Lezhava, T., Elie, C.M., Carlone, G.M., 2000. An analytical model applied to a multicenter pneumococcal enzyme-linked immunosorbent assay study. *J. Clin. Microbiol.* 38 (6), 2043–2050.
- Robinson, J., 2003. Bioassays—a continuously developing field. *Drug Discov. Today* 8 (15), 676–678.
- Smith, J.S., Yager, P.A., Baer, G.M., 1996. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. In: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*. WHO, Geneva, pp. 181–192.
- Smith, J.S., Yager, P.A., Baer, G.M., 1973. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull. World Health Organ.* 48, 535–541.
- Smith, J.S., 1991. Rabies serology. In: Baer, G.M. (Ed.), *The Natural History of Rabies*, 2nd ed. CRC, Florida, pp. 235–252.
- Trimarchi, C.V., Rudd, R.D., Safford Jr., M., 1996. An in vitro virus neutralization test for rabies antibody. In: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*. WHO, Geneva, pp. 193–199.
- United States Pharmacopoeia—USP29, 2007. NF24. Monographs: Rabies Immune Globulin; p. 1887.
- Webster, L.T., Dawson, J.R., 1935. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 32, 570–573.
- World Health Organization, 1998. Expert Committee on Biological Standardization. 39th report. Geneva WHO Technical Report Series No. 785.
- World Health Organization, 2004. Expert Consultation on Rabies, First report. Geneva WHO Technical Report Series No. 931.
- World Health Organization, 2007a. Human and animal rabies; Rabies: A neglected zoonotic disease. Available at: <http://www.who.int/rabies/en/>.

Author's personal copy

W.C. de Moura et al. / *Journal of Virological Methods* 154 (2008) 7–13

13

World Health Organization, 2007b. Rabies Surveillance Standards Excerpt from "WHO recommended standards and strategies for surveillance, prevention and control of communicable diseases". Available at: <http://www.who.int/rabies/epidemiology/Rabiessurveillance.pdf>.

World Health Organization, 2002. *Weekly Epidemiological Record*, No. 14 (77), pp. 109–120. Available at: <http://www.who.int/wer>.

World Health Organization, 1997. WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. Chp. 15, Validation of analytical assays. WHO, Geneva, pp. 65–73.

Zalan, E., Wilson, C., Pukitis, D., 1979. A microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. *J. Biol. Stand.* 7, 213–220.

3.2. MANUSCRITO 2

Potency evaluation of rabies vaccine for human use: the impact of the reduction in the number of animals per dilution (Journal of Virological Methods, doi: 10.1016/j.jviromet.2009.01.017). Disponível no Anexo 2 na formatação original.
Aceito em 21/01/2009.

Ms. Ref. No.: VIRMET-D-08-00473R1

Title: Potency evaluation of rabies vaccine for human use: the impact of the reduction in the number of animals per dilution
Journal of Virological Methods

Dear Wlamir,

I am pleased to confirm that your paper "Potency evaluation of rabies vaccine for human use: the impact of the reduction in the number of animals per dilution" has been accepted for publication in Journal of Virological Methods.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

A. Zuckerman
Editor-in-Chief
Journal of Virological Methods



Potency evaluation of rabies vaccine for human use: The impact of the reduction in the number of animals per dilution

Wlamir Corrêa de Moura^{a,b,*}, Humberto Pinheiro de Araujo^a, Pedro Hernan Cabello^c, Phyllis Catharina Romijn^d, José Paulo Gagliardi Leite^e

^a Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, Brazil

^c Departamento de Genética, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, Brazil

^d Secretaria Estadual de Saúde, Rua México, 128-413, Rio de Janeiro, Brazil

^e Laboratório de Virologia Comparada, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Pavilhão Hêlio e Peggy Pereira, Rio de Janeiro, Brazil

ABSTRACT

Article history:

Received 7 November 2008

Received in revised form 19 January 2009

Accepted 21 January 2009

Available online xxx

Keywords:

Rabies vaccine

NIH test

Potency testing

3Rs

In order to evaluate the effects of reducing the number of animals used in the NIH mouse protection test for potency determination of inactivated rabies vaccines for human use, a retrospective study of the results obtained in the Brazilian National Control Laboratory, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), was performed, comprising 214 vaccine lots. The INCQS Standard Operating Procedure establishes the use of three vaccine dilutions and 18 animals per dilution, separated into two cages with 9 mice each. The results of the two cages of each dilution were considered as two different groups (C1 and C2), and therefore, for each vaccine lot, three results were obtained: one for the standard test (ST) with 18 mice, one using the C1 cages with 9 mice and another using the C2 cages with 9 mice. The results were evaluated as repeated measures of the same method on the same samples. In this study, the effects of the reduction in: (a) the measurement error and its association with the size of measurement, (b) the agreement between the results using the concordance coefficient of correlation, (c) the agreement of categorized results as "Pass" or "Fail" using the Kappa index, (d) the precision of potency determinations using the 95% confidence interval and (e) the incidence of statistically invalid assays due to non-linearity and non-parallelism were evaluated. It was concluded that the results from the NIH mouse protection test using 9 mice per dilution are in good agreement with the results obtained using 18 mice per dilution. Therefore, nine animals per dilution is a suitable number to meet the statistical requirement for valid assays.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The intrinsic variability inherent in manufacturing biologicals requires the testing of all batches and serials (McVey et al., 2003). Traditionally, laboratory animals have played a major role in the quality control of vaccine batches. Consequently, the use of animals for this purpose is extensive, and there is a relatively high frequency of tests with substantial pain and suffering (Hendriksen et al., 1998). This is particularly true in potency tests, which can be multi-dose models that include a challenge procedure with virulent microorganisms in order to demonstrate the protective ability of the vaccine. Metz et al. (2002) reported that approximately 1.5 million animals per year were being used in Europe for routine quality control of vaccines, but no precise figures on animal use

are available, it is generally assumed that the number exceeds 15% of the total animals used in biomedical research (Hendriksen, 2007).

Theoretically, potency tests that depend on the *in vivo* immune response of laboratory animals would be more likely to detect low potency batches where the reduction in potency is the result of formulation problems (McVey et al., 2003). However, the predictive capacity of these tests for the vaccination of humans is questionable.

Quality control should be seen as an instrument for monitoring consistency in the production and testing of vaccines (Griffiths, 1996).

Russell and Burch's concept of the 3Rs (replacement, reduction and refinement) is a recognized worthwhile goal for animal welfare (van der Ark et al., 2000). It can be defined as: replacement, to substitute insentient material for conscious living higher animals; reduction, to reduce the numbers of animals used to obtain information, and refinement, to avoid unnecessary inhumane procedures applied to laboratory animals (for review, see Metz et al., 2002).

* Corresponding author at: Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, CEP 21045-900, Brazil. Tel.: +55 21 3865 5230; fax: +55 21 2290 0915.
E-mail address: wlamir.moura@incqs.fiocruz.br (W.C.d. Moura).

The evaluation of the potency of inactivated rabies vaccines has long been the subject of research. However, it has been difficult to identify a single method by which all of the necessary parameters of the different types of inactivated rabies vaccines can be satisfactorily measured (Barth et al., 1988). The National Institutes of Health (NIH) mouse protection test for the determination of potency was originally developed at the United States NIH (Bethesda, MD, USA). Briefly, the test measures the degree of protection conferred by inactivated rabies vaccines in immunized mice challenged intracerebrally with rabies virus (Wilbur and Aubert, 1996). The variability of this *in vivo* test is well known and can be measured using a reference vaccine in each test performed (Fitzgerald et al., 1978).

The NIH potency test was adopted by the World Health Organization (WHO) Expert Committee on Rabies and is now part of many national and international requirements for the evaluation of inactivated rabies vaccines. The test has been used without any significant improvements or alterations since its inclusion in the USA requirements in 1953 (Barth et al., 1988).

In 1992, the WHO recommended that the potency tests for inactivated rabies vaccines in animals should be replaced by an antigen quantification procedure. However, as a consensus was not achieved (Bruckner et al., 2003), the potency assay approved by the WHO "Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs" remains the NIH potency test. The NIH potency test was recognized as a reliable assay (WHO, 2007) despite the large number of animals and the pain and suffering inflicted upon them (Bruckner et al., 2003).

Currently, groups containing an equal number of animals are used for the test and reference vaccines. When veterinary vaccines are being evaluated, each group contains 10 mice with a single immunization (Council of Europe, 2008a; OIE, 2004), while vaccines for human use require between 16 (Wilbur and Aubert, 1996) and 18 (Farmacopéia Brasileira, 2004) animals in each group, with two immunizations 7 days apart.

A simplified test using a single dilution of the vaccine has been suggested by the WHO (2007) and the European Pharmacopoeia (*Ph. Eur.*), but such a test only determines if the vaccine has a potency significantly higher than the required minimum. The simplified test does not generate information on the validity of each individual potency determination, such as the slope, linearity and parallelism, because there is no dose–response curve (Council of Europe, 2008a).

Applying the 3Rs concept to bacterial vaccines, Hendriksen et al. (1987) published a study evaluating the effects of the reduction in the number of animals for the potency test of adsorbed diphtheria and tetanus vaccines, using a practical approach for retrospective data analysis. Based on the results of this study, and similar studies, the *Ph. Eur.* and the WHO now specify that only enough animals should be used to achieve a confidence interval within the specified range for these bacterial vaccines (Hendriksen, 2004).

Bruckner et al. (1988) performed a study on rabies vaccines for human and veterinary use and recommended that at least four dose groups of 10 mice should be used for testing. They also stated that it would not be possible to reduce the number of mice used in the NIH test to less than 10 because such a reduction would lead to results that would be much less precise.

Weisser and Hechler (1997) stated that the difference between the test procedures for human use and veterinary vaccines were incomprehensible and lacked any scientific basis. These authors suggested, by analogy with the requirements for the potency testing of bacterial vaccines, that the number of animals in the NIH test for human use vaccines (at that time at least 16 per dilution) should be left open and that there was evidence that this number

could be reduced to 10 animals per group, as already stipulated by the monograph for the evaluation of rabies vaccines for veterinary use.

As a consequence, the monograph for rabies vaccines for human use by the *Ph. Eur.* no longer specifies the number of animals but suggests that a suitable number of animals should be used to meet the statistical requirement for a valid test.

In Brazil, prior to batch release, the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), the National Control Laboratory of the Ministry of Health, has been performing the NIH test since 1987, according to the Brazilian Pharmacopoeia (*Ph. Bras.*) monograph for rabies vaccine for human use, using 18 animals per dilution (Farmacopéia Brasileira, 2004).

The aim of this manuscript is to retrospectively evaluate the effect of reducing the number of mice used per dilution, from 18 to 9, for the routine NIH test to evaluate the potency of rabies vaccines for human use.

2. Animals, material and methods

2.1. Animals

Male and female Swiss mice (weighing 11–15 g) from the Fundação Oswaldo Cruz breeding stock were used. The mice were housed in standard plastic cages with stainless-steel covers and wood shavings as bedding and kept under controlled temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$, approximately 70% relative humidity and a 12:12 h photoperiod with lights on at 08:00). A standard commercial diet for laboratory rats and mice (CR1 Nuvital, Nuvilab Ltd., Curitiba, PR, Brazil) and tap water were provided *ad libitum*. The experimental protocols were performed in accordance with the EC Directive 86/609/EEC for animal experiments and were approved by the "Ethics Committee on the Use of Laboratory Animals of Fundação Oswaldo Cruz" (CEUA – FIOCRUZ).

2.2. NIH test

The NIH test was conducted by immunizing at least two sets of at least three groups of mice twice intraperitoneally 7 days apart. The mice were immunized with 0.5 ml of at least three dilutions of the reference vaccine or the test vaccines. Seven days after the last vaccination, the immunized animals and the control non-immunized group were challenged intracerebrally with 0.03 ml of the Challenge Virus Standard (CVS) mouse-brain strain of fixed rabies virus (Wilbur and Aubert, 1996). The mice were observed for 14 days, and the relative potency, expressed in IU/dose of the test vaccine, was calculated using the probit analysis.

At the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, the NIH test is performed following the *Ph. Bras.* (Farmacopéia Brasileira, 2004), using three dilutions. For each dilution, 18 animals are randomly distributed between two cages (nine animals each), and the results are registered separately for each cage. Therefore, for each lot, six cages with nine animals each are used.

In order for the test to be considered valid, specific criteria had to be achieved: a significant slope, no significant deviations from linearity or parallelism in the dose–response curve, the challenge virus titer (at least 10 times the mouse intracerebral 50% lethal dose) and confidence limits of the estimated potency ($p = 0.95$). In order to pass the test, the lot must retain a minimum potency value, depending upon the vaccine type.

The retest criteria adopted at the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde for the potency test of a rabies vaccine for human use are that a single failed test is not considered conclusive and that the vaccine is always retested at least once. If the weighted geometric mean (Council of Europe, 2008c) of these two results passes the test, it is conclusive. If that mean does not pass, another

Please cite this article in press as: Moura, W.C.d., et al., Potency evaluation of rabies vaccine for human use: The impact of the reduction in the number of animals per dilution. *J. Virol. Methods* (2009), doi:10.1016/j.jviromet.2009.01.017

retest is performed, and the weighted geometric mean of the three results is considered as the final potency result.

In the present study, only the valid tests were considered.

2.3. Retrospective study

This test procedure allowed us to consider the set formed by the first cages of each dilution as being one group (C1) and the set formed by the second cages of each dilution (C2) as one replicate of the first group.

The potency values were reviewed and analyzed using the probit analysis as described in the *Ph. Eur.* (Council of Europe, 2008c). For each assay, three results, expressed in IU/dose, were obtained for the relative potency: (1) the standard test (ST) using the score based on the number of survivors/deaths in all 18 animals per dilution, (2) the potency using only the score results of the first cage (C1) and (3) the potency using the score results of the second cages (C2) of each dilution. In order to avoid an additional loss of precision, the reference vaccine was always used for the calculations with 18 animals per dilution.

2.4. Vaccines

A total of 214 human use vaccine lots, of which 166 (77.57%) were from Suckling Mouse Brain vaccine (SMBV) and 48 (22.43%) were from tissue culture (46 (21.5%) were Purified Vero Cell vaccines, 1 (0.47%) was a Purified Duck Embryo Cell vaccine, and 1 (0.47%) was a Human Diploid Cell vaccine), were tested in 38 independent assays using 14,748 mice (11,556 for the vaccine lots and 3192 for the reference vaccine and challenge virus control). Three different lots of reference vaccines were used, the Brazilian national reference vaccine lot BR006 was used in 33 out of the 38 assay runs. The other five assays used another national reference vaccine or the WHO 5th International Reference.

2.5. Data analysis

The results obtained with the C1 and C2 groups are related to those of the ST group, but this is irrelevant for the evaluation of the effects of the reduction in the number of animals (Hendriksen et al. 1987). However, this did not permit the use of the most straightforward statistical methods for comparing the two groups.

Therefore, in order to demonstrate the reliability of the results obtained with the C1 and C2 groups, they were compared to the results obtained with the ST group (ST versus C1 and ST versus C2) as repeated measures of the same method.

As an exploratory data analysis, the fit of the potency results to the normal distribution was evaluated by histograms and the Kolmogorov–Smirnov test. The Student's *t* test for paired data was used to evaluate if there were statistically significant differences between the potency results of the three groups.

Since the fit to the normal distribution has been demonstrated and no significant differences between the results from the different group were detected, the other effects of the reduction were evaluated by determining the following parameters:

2.5.1. Effects of the reduction on the measurement error between the groups

Repeated measurements on the same subject will vary around the true value because of measurement error (Bland and Altman, 1996). The measurement error in logarithmic transformed data was evaluated using the within-sample coefficient of variation (Bland, 2005) between the ST and C1 groups, the ST and C2 groups and the C1 and C2 groups. This was also evaluated using the association of measurement error with the size of the measurement using the

Bland–Altman plot (Bland and Altman, 1986) and interpreted following the identity approach, as described by Petersen et al. (1997). These methods were used to demonstrate that the results of the groups did not deviate from each other by more than the inherent imprecision of the method by showing the normal distribution fit, evaluated with the chi-square test.

2.5.2. Concordance correlation coefficient (CCC)

Lin's CCC (Lin, 1989, 1992) was used on the logarithmic transformed data to examine the reproducibility of the continuous measurements using a single method by measuring the agreement to the identity line. It combines a coefficient of precision (Pearson coefficient of correlation), which measures how closely the observations fall on the fitted line, and a coefficient of accuracy, which measures how closely the fitted line agrees with the identity line. The coefficient of precision (squared) and the coefficient of accuracy are on a scale of 0% (no agreement) to 100% (perfect agreement) and can be used to identify when corrective action is needed. The CCC is the product of the coefficient of precision and the coefficient of accuracy (Lin, 2000).

The strength of the agreement expressed by the CCC between the ST and C1 groups and the ST and C2 groups was classified as Unsatisfactory (<0.6), Satisfactory (0.61–0.9) or Excellent (0.91–1.0), as described by Warke et al. (2001).

2.5.3. Cohen's Kappa index to evaluate the agreement of the results

The agreement between the ST and C1 groups and the ST and C2 groups was assessed using the Cohen's Kappa index. This is a measure of association (correlation or reliability) between two measurements in the same individual when the measurements are categorical. This index is often used as an inter-rater agreement evaluation tool. The potency results of the 214 lots were categorized as "Pass" or "Fail to Pass". The minimum requirements (Farmacopéia Brasileira, 2004) depended upon the type of vaccine (1.0 IU/dose for the SMBVs and 2.5 IU/dose for the cell culture vaccines). In order to check the agreement, vaccine lots that were categorized as "Fail to Pass" (23 lots, 10.75%) were included in the study. Contingency tables were then generated, and the Cohen's Kappa index was calculated and classified as Poor (<0.00), Slight (0.00–0.20), Fair (0.21–0.40), Moderate (0.41–0.60), Substantial (0.61–0.80) or Almost Perfect (0.81–1.00), as described by Landis and Koch (1977). The Kappa indices were also analyzed using the Bayesian approach, as described by McBride (2005), which demands a lower 95% one-sided confidence limit for Kappa indices greater than 0.60 to assure a "Substantial Agreement".

2.5.4. Effects on the 95% confidence limits

The effects of the reduction in the number of mice on the 95% confidence limits were assessed diagrammatically. This approach was applied to 51 lots (of 214 lots, 23.8%) that were randomly selected using randomly generated numbers. The lower and upper limits of the 95% confidence interval were expressed as a percentage of the potency values, as described by Hendriksen et al. (1987). Invalid assays were excluded from the calculations. The increase of the width for the confidence interval was evaluated comparing the limits of the mean of the three groups.

Furthermore, the criteria described by Weisser and Hechler (1997), i.e., adopting a lower confidence limit value instead of limiting the width of the confidence interval to 25–400%, were applied on the assays deemed invalid due to lower and/or upper limits that were outside of the specifications.

The effects of the reduction in the number of mice on the 95% confidence limits of the ED50 of the reference vaccine were also evaluated.

Please cite this article in press as: Moura, W.C.d., et al., Potency evaluation of rabies vaccine for human use: The impact of the reduction in the number of animals per dilution. *J. Virol. Methods* (2009), doi:10.1016/j.jviromet.2009.01.017

Table 1
Exploratory data analysis.

Data	n	Mean ^a	Log ^b	95% CI ^c	SD ^d	K-S p ^e	Conclusion
ST	214	2.034	0.3084	0.2697–0.3469	0.2861	0.268	Accept normality
C1	214	2.091	0.3205	0.2792–0.3622	0.3082	0.379	Accept normality
C2	214	2.010	0.3034	0.2624–0.3445	0.3047	0.081	Accept normality

^a Mean of potency in IU/dose.
^b Mean of logarithm of potency in IU/dose.
^c 95% confidence interval for mean of logarithm of potency in IU/dose.
^d Standard deviation of logarithm of potency.
^e p Value for Kolmogorov–Smirnov test.

2.5.5. Effects on linearity and parallelism

In the present study, only valid tests that did not presented deviations from linearity and parallelism were considered. The incidence of statistically invalid assays in the C1 or C2 groups due to non-linearity and non-parallelism as a consequence of the reduction in the number of mice was evaluated. This approach was applied to 51 of 214 lots (23.8%) that were randomly selected using randomly generated numbers.

3. Results

3.1. Exploratory data analysis

The logarithmic transformed data sets from the ST, C1 and C2 groups were analyzed using the Kolmogorov–Smirnov test in order to determine if they fit into a normal distribution. Outliers were not removed from the calculations. The mean and standard deviations are presented in Table 1, and all three data sets were normally distributed.

3.1.1. Comparison of the potency results

The results of the three groups were examined using the Student’s *t* test for paired data in order to determine if there were statistically significant differences between their means. No significant difference was found (Table 2).

3.2. Effects of the reduction of the number of tested animals on the measurement error between groups

3.2.1. Within-sample coefficient of variation

In order to evaluate the measurement error, the within-sample coefficient of variation (% CV) between the ST and C1 groups, the ST and C2 groups and the C1 and C2 groups was calculated.

The % CV was 25.29% between the ST and C1 groups and 23.32% between the ST and C2 groups. The intra-assay reproducibility of results using nine animals per dilution was 39.37% (between the C1 and C2 groups).

3.2.2. Bland–Altman plot

The plot of the difference of the ST and C1 (or C2) groups versus the average of the ST and C1 (or C2) groups demonstrated that the differences did not vary in any systematic way over the range of measurements in any of the groups (Fig. 1).

Table 2
Application of the Student’s *t* test for paired data.

Pairs	<i>t</i>	<i>p</i> ^a	d.f.	
Log ST × Log C1	-1.579	0.116	213	ns
Log ST × Log 2	0.652	0.515	213	ns
Log C1 × Log C2	1.296	0.196	213	ns

d.f. = degrees of freedom. ns = not significant.
^a *p* Value for *t* test.

The bias (log 10) was -0.0121 (SD log 10=0.1122), and the 95% limits of agreement (log 10) were -0.23 to 0.21 for ST minus C1 (Fig. 1A). Similarly, the bias (log 10) was 0.0050 (SD log 10=0.1122), and the 95% limits of agreement (log 10) were -0.22 to 0.23 for ST minus C2 (Fig. 1B).

3.2.2.1. Identity approach. The Bland–Altman plots were also evaluated using the identity approach with the chi-square test used to evaluate the normal distribution fit of the differences between the ST and C1 groups (d.f. = 12; chi-square = 17.964; *p* = 0.117) and between the ST and C2 groups (d.f. = 11; chi-square = 17.184; *p* = 0.103). Both comparisons accepted normality.

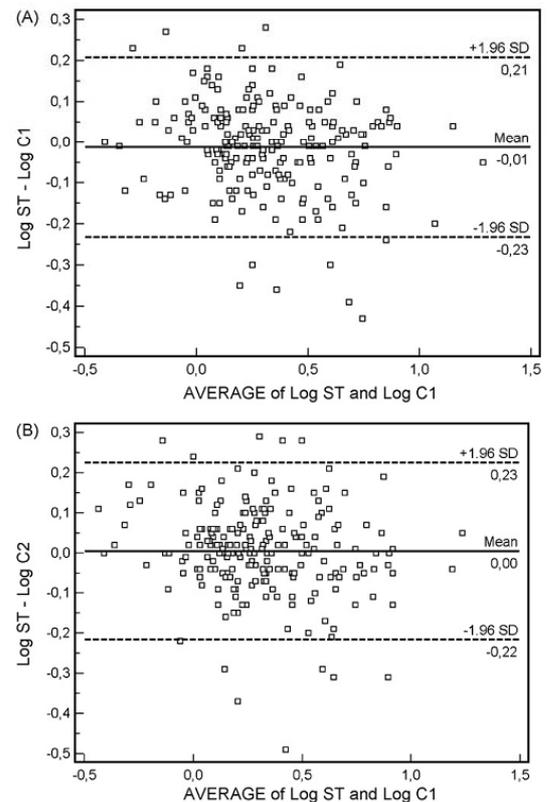


Fig. 1. Bland–Altman plot (n = 214). Graphs show the scatter plots of the difference between potencies against the average of the two potencies for each paired data point. (A) ST minus C1. (B) ST minus C2.

Please cite this article in press as: Moura, W.C.d., et al., Potency evaluation of rabies vaccine for human use: The impact of the reduction in the number of animals per dilution. J. Virol. Methods (2009), doi:10.1016/j.jviromet.2009.01.017

Table 3

Categorization of results as "Pass" or "Fail to pass" the test, per group, according to the minimum potency requirements.

ST-C1-C2	n	%	Agreement
P-P-P	170	79.44	A (88.79%)
F-F-F	20	9.35	
F-P-F	2	0.93	D-I (1.40%)
F-F-P	1	0.47	
P-P-F	10	4.67	D-II (9.81%)
P-F-P	11	5.14	
Total	214		

ST = standard test; C1 = cage 1; C2 = cage 2. n = number of samples. P = pass the test. F = fail to pass the test. A = agree. D = disagree. I = false positive. II = false negative.

3.3. Concordance correlation coefficient

The concordance correlation coefficient of the results of the ST and C1 groups was 0.9279 (95% CI = 0.9072–0.9442), with a precision of 86.71% (r^2) and an accuracy of 99.65%. The CCC of the results of the ST and C2 was 0.9277 (95% CI = 0.9068–0.9441), with a precision of 86.43% (r^2) and an accuracy of 99.79%. Therefore, the results of both pairs of data were in "Excellent Agreement".

3.4. Cohen's Kappa index

The Cohen's Kappa index was used to evaluate the agreement between results of the ST and C1 groups and the ST and C2 groups when the results were categorized as Pass or Fail to Pass. Table 3 shows the categorized data.

3.4.1. Agreement of results

One hundred ninety lots demonstrated a perfect agreement in the three groups. Twenty-three lots that originally failed to pass in the ST group were considered as true negative, and from these, 20 were in perfect agreement in the ST, C1 and C2 groups (Table 3).

A Cohen's Kappa index of 0.7299 (Substantial) was obtained when the ST results were compared to the results of C1 and of 0.7714 (Substantial) when the ST results were compared with the C2 results (Table 4).

There were 24 contradictory results: three samples that failed to pass in the ST group passed the test in the C1 or C2 groups (false positives), and 21 samples passed in the ST group but failed to pass in the C1 or C2 groups (false negatives; Tables 3 and 4).

Of these contradictory results, the number of false positives was 2 of 214 (0.93%) in the C1 group and 1 of 214 (0.47%) in the C2 group. The number of false negatives was 11 of 214 (5.14%) in the C1 group and 10 of 214 (4.67%) in the C2 group. Table 5 shows the analysis of the contradictory Pass/Fail results.

Table 4

Contingency tables for Cohen's Kappa index calculation.

	ST Pass	ST Fail	Total
A			
C1 Pass	180	2	182
C1 Fail	11	21	32
Total	191	23	214
B			
C2 Pass	181	1	182
C2 Fail	10	22	32
Total	191	23	214

ST = standard test, C1 = cage 1, C2 = cage 2. A – ST × C1: index = 0.7299, standard error: 0.0672. B – ST × C2: index = 0.7714, standard error: 0.0672.

Table 5

Difference between lower and upper confidence limits for potency values given as percentage of potency.

Group	n	LCL ^a	UCL ^b	Width ^c	Increase
ST	44	47.01	220.09	173.09	–
C1	44	39.03	272.76	233.72	35.03%
C2	44	39.78	258.25	218.47	26.22%

^a Mean % of potency lower confidence limit.

^b Mean % of potency upper confidence limit.

^c Difference between a and b.

3.4.2. Bayesian approach

The Kappa index was tested using a Bayesian approach, and a lower 95% one-sided confidence limit of 0.6193 and 0.6608 was obtained when the ST group was compared with the C1 or C2 group, respectively. Both values are greater than 0.60 (the highest value for a "Moderate Agreement" Kappa index), demonstrating that there was at least 95% confidence that the agreement between the ST group and either the C1 or C2 group was "Substantial" (see Section 2.5.3).

3.4.3. Retest simulation of contradictory results

As described in Section 2.2, vaccines that failed to pass the test are retested. In order to simulate a retest, the mean of the C1 and C2 groups was calculated, and the rates of false positives and negatives were re-evaluated. The number of contradictory results fell to 0 false positives and 3 (1.40%) false negatives in 214 samples (Table 6).

3.5. Effects on the 95% confidence interval

3.5.1. Effects on the 95% confidence Interval as percentage of potency results

Four of 51 lots (7.84%) in the C1 group and five of 51 lots (9.80%) in the C2 group failed to meet the WHO and Ph. Eur. requirements for confidence limits (25–400%), representing a total of seven lots that were excluded from the calculations. Fig. 2 com-

Table 6

Contradictory results expressed in IU/dose and classified as "Pass" or "Fail to pass".

Sample	Vaccine	ST ^a	C1 ^a	C2 ^a	Mean C1 and C2 ^a	Results	False
1	SMB	0.68	0.40	1.11	0.76	F-F-P-F	Positive
2	SMB	0.78	1.03	0.53	0.78	F-P-F-F	
3	CCV	2.06	2.85	1.51	2.18	F-P-F-F	
4	SMB	1.00	1.51	0.93	1.22	P-P-F-P	Negative
5	SMB	1.31	1.50	0.76	1.13	P-P-F-P	
6	SMB	1.07	1.50	0.76	1.13	P-P-F-P	
7	SMB	1.33	1.93	0.91	1.42	P-P-F-P	
8	SMB	1.25	2.51	0.90	1.71	P-P-F-P	
9	SMB	1.22	1.71	0.92	1.32	P-P-F-P	
10	CCV	3.57	5.78	1.87	3.83	P-P-F-P	
11	CCV	2.54	3.57	1.87	2.72	P-P-F-P	
12	SMB	1.18	0.96	1.45	1.21	P-F-P-P	
13	SMB	1.34	0.93	1.89	1.41	P-F-P-P	
14	SMB	1.28	0.91	1.81	1.36	P-F-P-P	
15	SMB	1.02	0.90	1.12	1.01	P-F-P-P	
16	SMB	1.01	0.54	1.95	1.25	P-F-P-P	
17	SMB	1.39	0.91	1.70	1.31	P-F-P-P	
18	SMB	1.01	0.85	1.21	1.03	P-F-P-P	
19	SMB	1.00	0.93	1.14	1.04	P-F-P-P	
20	SMB	1.17	0.79	1.69	1.24	P-F-P-P	
21	SMB	1.12	0.87	1.52	1.20	P-F-P-P	
22	SMB	1.01	0.79	1.09	0.94	P-F-P-F	
23	CCV	2.50	2.50	1.90	2.20	P-P-F-F	
24	SMB	1.00	1.40	0.52	0.96	P-P-F-F	

SMB – Suckling Mouse Brain vaccine, minimum potency requirement = 1.0 IU/dose. CCV – Cell Culture vaccine, minimum potency requirement = 2.5 IU/dose. P – Pass the test. F – Fail to pass the test.

^a Potency in IU/dose.

Please cite this article in press as: Moura, W.C.d., et al., Potency evaluation of rabies vaccine for human use: The impact of the reduction in the number of animals per dilution. J. Virol. Methods (2009), doi:10.1016/j.jviromet.2009.01.017

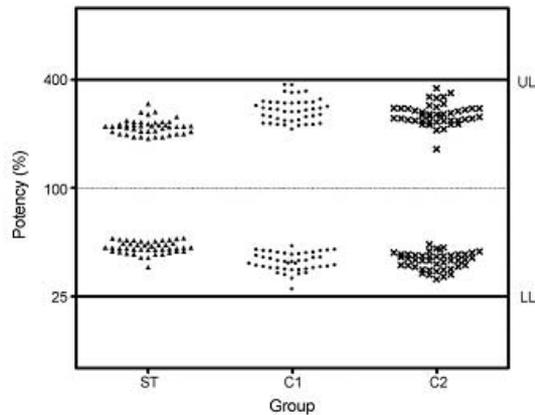


Fig. 2. The effect of the reduction in the number of animals per dilution on the NIH test potency results for rabies vaccine for human use. Vertical scatter diagrams of the percentage of potency plots for lower (LL) and upper (UL) confidence limits for the ST (n=44), C1 (n=44) and C2 (n=44) groups.

compares the lower and upper 95% confidence limits, represented as a percentage of potency, of the three groups. A total of 44 lots were evaluated, and the means for the confidence limits are presented in Table 5. The increase in the width of the confidence limits was 35.03% for the C1 group and 26.22% for the C2 group when the difference between the mean of the lower and upper confidence limits was compared with those obtained with the ST group (Table 5).

In INCQS, using the standard NIH test over the last 5 years, the rate of statistically invalid assays due to confidence intervals that were outside of the specified range was 6.16%.

3.5.2. Minimum requirement for lower confidence limit of potency

As suggested by Weisser and Hechler (1997), the effect of adopting a "minimum requirement for lower confidence limit of the estimated potency" instead of using the confidence interval range of 25–400% was tested. Applying this concept, all of the potency assays that were considered invalid, even those presenting satisfactory potency results, became valid. The suggested minimum values

should be 0.625 IU/dose for cell culture vaccines (25% of 2.5 IU/dose) and 0.25 IU/dose for SMBV (25% of 1.0 IU/dose).

3.5.3. Effects on the 95% confidence interval of the reference vaccine ED50

The impact of the reduction in mouse number on the precision of the determination of the ED50 for the Brazilian reference vaccine lot BR006 (n = 33) was evaluated. While the effect on the mean value was not significant (ST = 20.48; C1 = 21.26 and C2 = 22.42), there was an increase in the width of the confidence limits of the ED50 (C1 = 73.75% and C2 = 36.92%). This represents a reduction in the precision of the determination.

Fig. 3 plots the control charts for individual logarithmic ED50 values obtained in the ST group. The intermediate precision (inter-assay variation) was calculated using the ED50 results. The % CV was 43.09%, 69.49% and 61.34% in the ST, C1 and C2 groups, respectively.

3.6. Effects on linearity and parallelism

The incidence of statistically invalid assays due to non-linearity was 2 in 51 (3.92%) and 5 in 51 (9.8%) for the C1 and C2 groups, respectively. The incidence of statistically invalid assays due to non-parallelism was 4 in 51 (7.84%) and 1 in 51 (1.96%) for the C1 and C2 groups, respectively. The total number of statistically invalid assays due to non-linearity and/or non-parallelism was 6 in 51 (11.76%) in each group.

In INCQS, using the standard NIH test over the last 5 years, the rate of statistically invalid assays due to non-linearity was 1.68%, and the rate due to non-parallelism was 6.16%. The total rate of statistically invalid assays was 7.84%.

4 Discussion

The NIH mouse protection test is still the only potency test accepted by the WHO for the batch release of rabies vaccines for human use (WHO, 2007). This test requires a large number of animals and inflicts substantial suffering. Applying the 3Rs concept of Russell and Burch for the use of laboratory animals, we evaluated the impact of the reduction in the number of animals (from eighteen to nine per dilution) on the estimate of the potency according to the recommendations of Hendriksen et al. (1987), Hendriksen (2004), Weisser and Hechler (1997) and Bruckner et al. (1988, 2003).

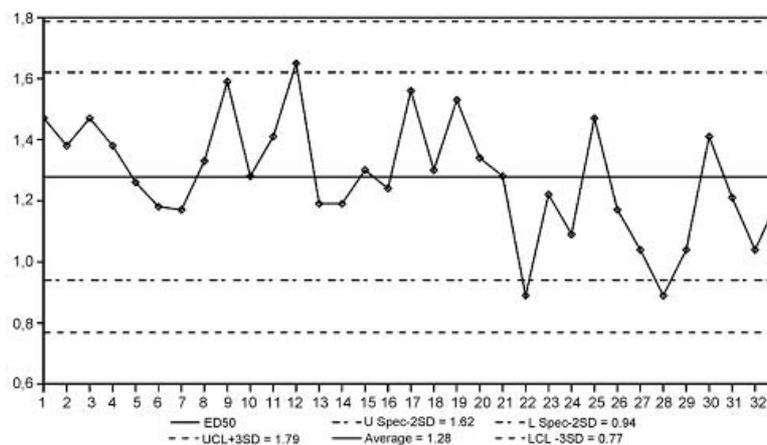


Fig. 3. Control chart of individual-x values for logarithm of ED50 for reference vaccine lot BR006.

Please cite this article in press as: Moura, W.C.d., et al., Potency evaluation of rabies vaccine for human use: The impact of the reduction in the number of animals per dilution. J. Virol. Methods (2009), doi: 10.1016/j.jviromet.2009.01.017

This study is a retrospective analysis of data from routine vaccine potency assays for batch release.

All of the data sets (ST, C1 and C2) fit into a normal distribution, as determined using the Kolmogorov–Smirnov test. No significant differences were found between the mean of the three data sets when analyzed using the Student's *t* test for paired data.

The measurement error determined by the within-sample coefficient of variation (Bland, 2005) between the ST and C1 groups and between the ST and C2 groups was 25.29% and 23.32%, respectively. The within-sample coefficient of variation between the C1 and C2 groups was 39.47%. These results demonstrate an acceptable variability for an *in vivo* assay, since the WHO (1997a) states that *in vitro* and *in vivo* assays could present variability above 50%.

When the reference vaccine was evaluated, there was no significant increase in the mean ED50 (ST = 20.48, C1 = 21.26 and C2 = 22.42). However, there was a significant increase in the width of the confidence limits of the ED50 (C1 = 73.75% and C2 = 36.92%), which was a consequence of the reduction in the precision of the determination when the reference vaccine ED50 was calculated using nine animals per dilution. As the results of the reference vaccine can invalidate an entire test if some criteria are not fulfilled (e.g., linearity in the dose–response curve), in order to avoid an additional loss of precision in the test, we decided to keep using 18 animals per dilution for the reference vaccine in the NIH test. While the reduction in the number of animals tested was only applied to the test vaccine in the present study, as indicated by the mean ED50, the reduction can also be adopted to the reference vaccine.

The % CV of the ED50 for reference vaccine was 43.09% in 33 out of the 38 assays in the present study. In the Bruckner et al. (2003) study, the standard deviation in 24 NIH tests carried out with a reference vaccine was 45%, and in 38 NIH tests, it was 115%. The WHO (1997a) states that *in vitro* and *in vivo* assays could present variability above 50%.

The ST minus C1 and ST minus C2 results, when treated as repeated measures, presented no significant tendency for the amount of variation to change with the magnitude of the measurements in any of the two groups (Bland and Altman, 1986). Applying the identity approach as described by Petersen et al. (1997), the results from the repeated measures did not deviate from each other by more than the inherent imprecision of the assay, assuming a normal distribution of results, as determined using the chi-square test. This shows the good reproducibility of the results between the ST and C1 groups and between the ST and C2 groups.

The concordance correlation coefficient demonstrated "Excellent Agreement" between the results of the ST and C1 groups and between the ST and C2 groups, as classified by Warke et al. (2001), which demonstrate that NIH assay using nine animals per dilution can provide results comparable to those of the standard NIH test.

The Cohen's Kappa index of the categorized potency results (Pass or Fail) between the ST and C1 groups and between the ST and C2 groups demonstrated "Substantial Agreement" (Landis and Koch, 1977). A number of false negatives in the C1 (5.4%) and C2 (4.7%) groups and a very low occurrence of false positives in the C1 (0.9%) and C2 (0.5%) groups were observed.

Following the WHO guidelines (1997b), there should be less than 10% contradictory conclusions between an alternative simplified method and a standard test. The incidence of contradictory results in the C1 group was 6.3% and 5.2% in the C2 group, both significantly lower than 10%. According to our Standard Operative Procedures, all samples that fail to pass the test must be retested at least once and results are combined by weighted geometric mean. The weighted geometric mean value between the two potencies is considered, and if that mean passes the test, the sample passes the test. If that mean does not pass the test, one more repetition is performed, and the weighted geometric mean of the three results is considered the final result.

When this situation was simulated, using the C2 group as the retest of the C1 group, and vice versa, the number of contradictory results fell to zero false positives and 1.4% false negatives.

The precision of the potency values is indicated by the 95% confidence limits (Hendriksen et al., 1987). The *Ph. Eur.* and the WHO recommend a range of 25–400% for the confidence limits in the NIH test (Council of Europe, 2008b; WHO, 2007). In the present study, 4 in 51 samples (7.84%) in the C1 group and 5 in 51 samples (9.80%) in the C2 group failed to meet this requirement (25–400%). Therefore, 8.8% (mean) of the assays were considered invalid as a consequence of the reduction in the number of tested animals. These results are in agreement with those obtained with the standard NIH test at the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde over the last 5 years (6.16% of invalid tests). These results also agree with those described by Hendriksen et al. (1987).

Weisser and Hechler (1997), in a critical review of the *Ph. Eur.* rabies vaccine monographs based on the 3Rs concept, suggested that instead of restricting the confidence interval to 25–400%, it would be more useful to stipulate a minimum value. This value should be exceeded by the lower confidence limit in order to guarantee suitable potency, as is the case for other potency tests (e.g., diphtheria, tetanus). This minimum value would be derived from the current requirements and is 0.625 IU/dose for cell culture vaccines (25% of 2.5 IU/dose). In the present study, when this concept was applied, all of the potency assays that were considered invalid, even those presenting satisfactory potency results, became valid. This demonstrates how the adoption of this concept would avoid re-testing vaccines that had already reached the minimum potency requirements in the first test.

The incidence of statistically invalid assays due to non-linearity and/or non-parallelism was 11.76% (6 in 51) for both the C1 and C2 groups. These results were in accordance with the WHO recommendation of less than 20% rejections due to deviations from either linearity or parallelism (WHO, 1997b). Hendriksen et al. (1987) reported 3 of 38 (7.89%) invalid assays due to non-parallelism or non-linearity in their study evaluating reductions in the animal number from 20 to 12 in order to evaluate the potency of diphtheria vaccine components.

Invalid assays due to these deviations are also frequent in the standard NIH test. At the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde over the last 5 years, 7.84% of the tests were deemed invalid due to non-linearity or non-parallelism. Therefore, the real increase in the number of invalid tests is 3.92%. As a practical example, if 18 animals were used per dilution (testing three dilutions = 54 animals per vaccine), for each 100 assays performed to test a single sample, based on a 7.84% rate of invalid assays, a total of 5822 mice would be used. If the number of mice were reduced to nine per dilution (testing three dilutions = 27 mice per vaccine), for each 100 assays performed to test one sample, based on an 11.76% rate of invalid assays, a total of 3018 mice would be used for the test vaccine. This represents a reduction of approximately 48% in the number of mice used. Applying this to the tests using 16 mice per dilution (also considering a 7.84% invalidation rate), this reduction would be about 42% for each tested vaccine.

Bruckner et al. (1988) stated that it would be not possible to reduce the number of mice used in the NIH test to less than 10 because this reduction would lead to results that would be much less precise. Weisser and Hechler (1997) suggested that the number of animals required for testing should be left open and that each laboratory could determine or confirm the number of animals that required to satisfy the requirements for a valid test. Additionally Weisser and Hechler (1997) suggested that there was evidence, based on the NIH test results for veterinary vaccines, that this number could be reduced to 10 animals per dilution.

Please cite this article in press as: Moura, W.C.d., et al., Potency evaluation of rabies vaccine for human use: The impact of the reduction in the number of animals per dilution. *J. Virol. Methods* (2009), doi:10.1016/j.jviromet.2009.01.017

The requirements for a valid test for veterinary vaccines are the same as those for rabies vaccines for human use, except that the minimum potency requirement for human vaccines (2.5 IU/dose) is greater than that used for veterinary vaccines (1.0 IU/dose) (Weisser and Hechler, 1997).

Even though a simplified single dilution NIH test is available, it only determines if the vaccine has a potency significantly higher than the required minimum. The single dilution NIH test does not provide full information on the validity of the determination of each individual potency, and it is only recommended for laboratories that have expertise in performing NIH multiple-dilution assays. Furthermore, if a batch of vaccine fails to meet the specifications set for the simplified test, a full NIH mouse protection test should be performed (WHO, 2007). Therefore, the simplified test is particularly useful for testing multiple batches of a vaccine within a short time. The WHO recommends that several prerequisites and conditions should be considered before adopting a single dilution assay (WHO, 2007). However, due to its lack of precision, the minimum potency requirement for vaccines tested by the modified test is higher than that for vaccines tested by the standard NIH test (Wilbur and Aubert, 1996). Bruckner et al. (2003) stated that must be recognized that this testing scheme may not be applicable to all the rabies vaccines on the market.

The results of this study indicate that the replacement of the standard NIH test by a variant of the assay using only nine mice per dilution of the vaccine seems to be feasible for routine potency assays. The tests using the lower number of mice provide results equivalent to the standard NIH test with full statistical information on the validity of each individual potency determination. If applied, this would result in a 42–48% reduction in the number of mice used, even considering a slight increase in the incidence of invalid assays.

The results also demonstrated that the adoption of a lower confidence limit of 25% of the estimated potency instead of a range for the confidence interval, as suggested by Weisser and Hechler (1997) and similar to what has been already established for comparable potency tests (e.g., diphtheria, tetanus, pertussis), would avoid re-testing vaccines that had already reached the minimum potency requirements in the first test.

5. Conclusion

This study, based on the retrospective statistical evaluation of data, indicates that a reduction from 18 mice to nine mice per dilution in the NIH test seems to be feasible and this number of mice is suitable to meet the statistical requirement for valid assays. However, further studies should be done in order to evaluate the inter-laboratory variability (reproducibility) of this alternative protocol.

As an illustration of the impact of such a reduction, the 11,556 mice used in the present study to determine the potency of the vaccines using the NIH mouse protection test would be reduced to 5778 using only nine mice per vaccine dilution for the test vaccines.

Acknowledgments

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil; Ministério da Saúde – Programa Nacional de Imunizações; Mr. David Le-Talec (Glaxo Smith Kline – Biologicals Rixensart, Belgium) for advise in statistical issues, Mrs. Eleonora Meira de Vasconcelos from Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, for English revision and Mr. Bertrand Poirier (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, Lyon, France) for the helpful discussion and suggestions upon statistical issues.

References

- Barth, R., Diderrich, G., Weinmann, E., 1988. NIH test, a problematic method for testing potency of inactivated rabies vaccine. *Vaccine* 6, 369–377.
- Bland, J.M., Altman, D.G., 1986. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1, 307–310.
- Bland, J.M., Altman, D.G., 1996. Statistics Notes: Measurement Error. *BMJ*, 313, 744. Available at: <http://www.bmj.com/cgi/content/full/313/7059/744>.
- Bland, J.M., 2005. How should I calculate a within-subject coefficient of variation? Available at: <http://www-users.york.ac.uk/~mb55/meas/cv.htm>.
- Bruckner, L., Cussler, K., Halder, M., Barrat, J., Castle, P., Duchow, K., Gatewood, D.M., Gibert, R., Groen, J., Knapp, B., Lavis, R., Milne, C., Parker, S., Stünkel, K., Visser, N., Volker, P., 2003. Three Rs approaches in the quality control of inactivated Rabies vaccines. *ATLA* 31, 429–454.
- Bruckner, L., Palatini, M., Ackermann, M., Müller, H.K., Kihm, U., 1988. Reduction in the number of mice used for potency testing of human and animal rabies vaccines. *Experientia* 44, 853–857.
- Council of Europe, 2008a. Rabies vaccine (inactivated) for veterinary use (Monograph no. 0451). In: *The European Pharmacopoeia*, 6th ed., Strasbourg, France, pp. 790–792.
- Council of Europe, 2008b. Rabies vaccine for human use prepared in cell cultures (Monograph no. 0216). In: *The European Pharmacopoeia*, 6th ed., Strasbourg, France, pp. 836–838.
- Council of Europe, 2008c. Assays depending upon quantal responses. In: *The European Pharmacopoeia*, 6th ed., Strasbourg, France, pp. 580–582 (Chapter 4 – General texts).
- Pharmacopéia Brasileira, Fascículo 5, 2004. 4a Edição, parte II – Vacina Contra Raiva Uso Humano, mon. 120. Atheneu Ed. São Paulo, SP.
- Ritzgerald, E.A., Gallagher, M., Hunter, W.S., Selligmann Jr., E.B., 1978. Use of the antibody assay in immunized mice for the determination of rabies vaccine potency. *Develop. Biol. Stand.* 40, 183–186.
- Griffiths, E., 1996. Assuring the quality of vaccines: regulatory requirements for licensing and batch release. In: Robison, A., Farrar, G., Wibl, C. (Eds.), *Methods in Molecular Medicine: Vaccine Protocols*. Humana Press, USA, 269–288.
- Hendriksen, C.F.M., Spieser, J.M., Akkermans, A., Balls, M., Bruckner, L., Cussler, K., Daas, A., Descamps, J., Dobbelaer, R., Fentem, J., Halder, M., van der Kamp, M., Lucken, R., Milstien, J., Sesardic, D., Straughan, D., Valadares, A., 1998. Validation of alternative methods for the potency testing of vaccines. *ATLA* 26, 747–761.
- Hendriksen, C.F.M., 2007. Three Rs achievements in vaccinology. *AAETEX* 14, 575–579. Special Issue.
- Hendriksen, C.F.M., 2004. Reduction of numbers of animals used in the Quality Control of Biologicals. *ATLA* 32 (2), 53–58.
- Hendriksen, C.F.M., van der Gun, J.W., Marsman, F.R., Kraefenberg, J.G., 1987. 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.* 15, 353–362.
- Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159–174.
- Lin, L.I.-K., 1989. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics* 45, 255–268.
- Lin, L.I.-K., 1992. Assay validation using the concordance correlation coefficient. *Biometrics* 48, 599–604.
- Lin, L.I.-K., 2000. Total deviation index for measuring individual agreement with applications in laboratory performance and bioequivalence. *Stat. Med.* 19, 255–270.
- McBride, G.B., 2005. Using Statistical Methods for Water Quality Management. Issues problems and solutions. In: Cohen's Kappa for Dichotomous Variables. John Wiley & Sons, New Jersey, 232–235.
- McVey, D.S., Galvin, J.E., Olson, S.C., 2003. A review of the effectiveness of vaccine potency control testing. *Int. J. Parasitol.* 33, 507–516.
- Metz, B., Hendriksen, C.F.M., Jiskoot, W., Kersten, G.F.A., 2002. Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. *Vaccine* 20, 2411–2430.
- OIE (Office International des Epizooties), 2004. Paris, France. Rabies, in Manual of standards for diagnostic test and vaccines. Available at: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00044.htm.
- Petersen, P.H., Stöckl, D., Blaabjerg, O., Pedersen, B., Birkemose, E., Thienpont, L., Lassen, J.F., Kjeldsen, J., 1997. Graphical interpretation of analytical data from comparison of field method with reference method by use of difference plots. *Clin. Chem. Vol.* 43 (11), 2039–2046.
- van der Ark, A., Kappelle, I.S., Ólander, R.M., Enssle, K., Jadhav, S., Donk, H., Hendriksen, C.F.M., 2000. The Pertussis Serological Potency test collaborative study to evaluate replacement of the mouse protection test. *Biologicals* 28, 105–118.
- Wärke, T.J., Kamath, S., Fitch, P.S., Brown, V., Shields, M.D., Ennis, M., 2001. The repeatability of nonbronchoscopic bronchoalveolar lavage differential cell counts. *Eur. Respir. J.* 18, 1009–1012.
- Wilbur, L.A., Aubert, F.A.M., 1996. The NIH test for potency. In: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*. World Health Organization, Geneva, pp. 360–368.
- Weisser, K., Hechler, U., 1997. Animal Welfare Aspects in the Quality Control of Immunologicals. A Critical Evaluation of Animal Tests in Pharmacopoeial monographs. FRAME, Nottingham, UK, 177–189.

Please cite this article in press as: Moura, W.C.d., et al., Potency evaluation of rabies vaccine for human use: The impact of the reduction in the number of animals per dilution. *J. Virol. Methods* (2009), doi:10.1016/j.jviromet.2009.01.017

World Health Organization, 1997a. WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2. Validation. Chapter 15. Validation of analytical assays. Geneva: pp. 69–73.

World Health Organization, 1997b. BLG 97.4. Manual of laboratory methods for potency testing of vaccines used in the WHO expanded program on immuniza-

tion. Chapter 27. Use and validation of a single vaccine dilution assay for testing the potency of Diphtheria, Tetanus and combined vaccines. pp. 162–174.

World Health Organization, 2007. Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs. WHO Technical Report Series, No. 941. Geneva, pp. 109–110.

Please cite this article in press as: Moura, W.C.d., et al., Potency evaluation of rabies vaccine for human use: The impact of the reduction in the number of animals per dilution. *J. Virol. Methods* (2009), doi:10.1016/j.jviromet.2009.01.017

3.3. MANUSCRITO 3

Método Reduzido de Detecção de Vírus Infectivo Residual em Vacinas Contra Raiva

Método Reduzido para Detecção de Vírus Infectivo Residual em Vacinas Contra Raiva

1. Introdução

A primeira geração de vacinas contra Raiva apresentava vírus Rábico ativo, em consequência casos de Raiva vacinal eram freqüentes durante sua utilização. Isto levou à adoção de métodos para a inativação das vacinas contra Raiva, a partir de sua segunda geração (SEMPLE, 1911).

Em Fortaleza, no Brasil, no ano de 1960 ocorreu o maior acidente descrito de Raiva vacinal, morreram 18 de 66 pessoas que receberam injeções de vacina do tipo Fermi impropriamente inativada, 13 daqueles nem haviam sido expostos a animais realmente raivosos. Os períodos de incubação variaram de 4 a 13 dias. Os vírus identificados nos cérebros dos pacientes tinham “todas as características de vírus fixo” (PARÁ, 1965). No passado o diagnóstico de Raiva vacinal era mais freqüentemente considerado quando uma variedade de tipos de vacinas, com vírus com capacidade infectiva eram utilizados. Em 1975 a OMS contra indicou a utilização de vacinas com vírus rábico ativo.

Tornou-se então ainda mais importante a pesquisa de vírus rábico infectivo residual em tais vacinas.

A técnica para detecção de vírus infectivo residual nas vacinas contra Raiva adotada no Brasil, é a descrita na *Ph. Bras.* (Farmacopéia Brasileira, 2004).

Atualmente, a maioria das vacinas contra Raiva são inativadas pela beta-propiolactona, um agente eficiente e seguro para a inativação de vacinas.

O Comitê de Especialistas em Raiva da OMS, em seu primeiro informe (o nono, na verdade) continua recomendando o isolamento de vírus rábico para o diagnóstico da doença e com esta finalidade sugere a utilização de células da linhagem neuroblastoma murino (NA C1300), ou a inoculação em camundongos, preferivelmente, onde fosse possível, a utilização de camundongos lactentes com menos de três dias de idade por serem mais sensíveis ao vírus rábico do que

camundongos desmamados ou adultos e sugerem ainda que o período de observação seja reduzido através do exame dos cérebros dos animais inoculados em três a quatro dias (ou mais), após a inoculação, utilizando a IFD (WHO, 2004).

O método de IFD é considerado o teste de microscopia de maior exatidão disponível para o diagnóstico rápido da Raiva (DEAN et al., 1996), mesmo considerando-se a existência de técnicas mais modernas para este fim, como a PCR.

2. Justificativa

SILVA (2000) demonstrou que a confirmação do diagnóstico da Raiva, para “vírus de rua”⁵, em camundongos pode ser obtida aos sete dias após a inoculação, através da utilização de camundongos lactentes com sacrifício aos sete dias e realização de IFD do cérebro.

Desta forma, com relação à monografia da *Ph. Bras.*, a utilização de camundongos lactentes somente, já seria suficiente, uma vez que estes são mais sensíveis ao vírus rábico do que os camundongos adultos. A OMS preconizava a utilização de apenas 20 camundongos de 15 a 20g para a detecção de vírus rábico infeccioso residual.

A utilização da VPCV no Brasil, no presente, facilita a utilização do cultivo celular para detecção de vírus rábico infeccioso residual, uma vez que estas vacinas são muito purificadas, no entanto a técnica descrita na *Ph. Eur.* tem duração tão longa quanto a prova em animais, 21 dias (no mínimo) e uma vez que o custo estimado de uma dose desta vacina seja de cerca de US\$ 7 e a recomendação é que se utilizem 25 doses para inoculação (*Ph. Eur.*, 2008; WHO, 2007c), o que representaria US\$ 175 em vacinas, só para este teste.

O diagnóstico *in vitro* de casos de Raiva a partir de cérebro de animais vem sendo utilizado em rotina desde a década de 1980, estando disponíveis linhagens celulares como a BHK-21 e o neuroblastoma murino mais sensíveis ao vírus rábico do que aquelas utilizadas na produção de vacinas como as células Vero e

⁵ - Termo cunhado por Pasteur para designar amostras de vírus isoladas de casos naturais da doença

as células diplóides humanas (RUDD et al., 1980; WEBSTER, 1986; RUDD & TRIMARCHI, 1987 e 1989). A revisão das orientações para produção de vacinas contra Raiva publicada pela OMS recomenda a utilização destas células mais sensíveis para detecção de vírus infectivo residual em tais vacinas (WHO, 2007c).

3. Material e Métodos

Sugerimos uma redução e um refinamento da técnica para apenas dez camundongos lactentes com sacrifício aos cinco dias e teste pela IFD e a adoção da inoculação em cultivo celular para detecção de vírus rábico infeccioso residual em substituição ao ensaio em camundongos, ou como prova complementar ao ensaio em lactentes.

Para avaliar a confiabilidade do ensaio em camundongos lactentes foi testada a sensibilidade deste sistema através da inoculação de 10 lactentes com sacrifício aos cinco dias e exame pela técnica IFD para Raiva em paralelo à inoculação de 20 camundongos de 11 a 15 g, com o objetivo de demonstrar que o teste realizado em lactentes apresenta, pelo menos, a mesma sensibilidade de detecção do vírus Rábico que a dos camundongos de 11 a 15 g.

Para avaliar a confiabilidade de um sistema de diagnóstico em células foi testada a sensibilidade de uma técnica de diagnóstico de Raiva em células BHK-21 em comparação com os resultados das técnicas in vivo.

3.1.1. Animais

Foram usados camundongos albinos suíços, machos ou fêmeas, desmamados, pesando de 11 a 15 g e lactentes (com zero a três dias de idade) do plantel da Fundação Oswaldo Cruz. Os camundongos foram acondicionados em gaiolas padrão de plástico com tampas de aço inoxidável e serragem de madeira como cama e acondicionados sob temperatura controlada (23 +/-1 °C), umidade relativa (aproximadamente 70%) e 12:12 h de foto período com as luzes acendendo às 08:00 h. Água potável e uma ração comercial padrão para camundongos e ratos de laboratório (CR1 Nuvital, Nuvilab Ltd., Curitiba, PR,

Brazil) foram administrada *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais de laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA - FIOCRUZ) e obteve a licença nº L-022/06.

3.1.2. Células

Células BHK-21 (C13) foram adquiridas na *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, USA). As células recebidas da ATCC foram utilizadas na produção de um lote mãe semente pelo Setor de Cultura de Células - Laboratório de Vacinas Virais – Departamento de Imunologia – INCQS, mantido congelado em Nitrogênio líquido neste Setor. As células foram fornecidas mediante prévia solicitação, sendo descongeladas em tal setor, semeadas e fornecidas ao laboratório de Raiva em garrafas com monocamadas confluentes e mantidas neste laboratório por quatro a oito passagens com repiques semanais.

3.1.3. Meio de cultura

O Meio de Dulbecco suplementado com 2,5% de Soro Fetal Bovino foi utilizado para manutenção das células e diluição da amostra de vírus durante a realização dos ensaios em células.

3.1.4. Vírus

Foi utilizado um lote de vírus rábico de trabalho da cepa vacinal PV (“Pasteur Vaccine”, Instituto Pasteur, Paris, França) lote PV-01/04, produzido utilizando lote semente fornecido pelo Instituto Butantan (São Paulo, SP) produzido em células BHK-21, segundo SMITH (1996). O título do lote de vírus foi previamente determinado como sendo $10^{5.0}$ por 0,03 ml/via i.c. em camundongos. Os cálculos subseqüentes foram baseados neste título.

3.1.5. Conjugados anti-rábicos

Foram utilizados: o conjugado anti-rábico para diagnóstico *in vitro* (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France – cat. # 72114) para o ensaio em células e o

conjugado adsorvido para diagnóstico em impressões de cérebro (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France – cat. # 72112) para o ensaio em animais.

3.1.6. Biossegurança

Os ensaios foram desenvolvidos em laboratórios independentes: a) Ensaio em animais, no laboratório de ensaios *in vivo* no Setor de Animais de Laboratório, Departamento de Farmacologia e Toxicologia; b) Ensaio em células: laboratório de ensaios *in vitro*, no Setor de Vacinas Virais – Raiva, do Laboratório de Vacinas Virais, Departamento de Imunologia. Ambos laboratórios contam com equipamentos de uso exclusivo no local. Neles, são adotadas as medidas de biossegurança para trabalhos com vírus rábico descritas por KAPLAN (1996).

3.1.7. Recursos

A realização dos testes para as modificações do ensaio de detecção de vírus rábico infeccioso residual já constava como meta proposta no Planejamento Estratégico do INCQS e sua realização e custeio foram previstos, com solicitação de compra, pelo INCQS, de alguns itens necessários não disponíveis. O projeto estava, também, incluído no Plano de Objetivos e Metas (POM) do INCQS.

3.2. Metodologias

3.2.1. Ensaio em animais

Para detecção do vírus rábico em camundongos foram realizadas as técnicas de inoculação em camundongos descrita por KOPROWSKI (1996) e a prova de anticorpos fluorescentes descrita em CEPANZO (1975). Foram realizadas dez repetições do ensaio.

3.2.2. Ensaio em cultivo de células

Uma técnica de inoculação adaptada das técnicas descritas por WEBSTER & CASEY (1996) e TRIMARCHI et al. (1996) foi harmonizada. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Raiva, Setor de Vacinas Virais – Raiva, do

Laboratório de Vacinas Virais, Departamento de Imunologia, INCQS. Foram realizadas quatro repetições do ensaio.

3.3. Experimentos

3.3.1. Inoculação em camundongos lactentes

Foram realizadas quatro diluições fator 1:4,5 contendo 10; 2,5; 0,5 e 0,125 DL50 do vírus lote PV-01/04 baseado no título obtido pelo vírus (10^5), as diluições utilizadas foram $10^{-4.0}$; $10^{-4.65}$, $10^{-5.3}$ e $10^{-5.9}$.

Cada diluição foi inoculada paralelamente em:

- Um grupo de 10 camundongos lactentes (CL);
- Dois grupos de 10 camundongos de 11 a 15g (CA);

Desta forma a cada ensaio foram inoculadas quatro caixas com CL e oito caixas com CA.

Inicialmente, o sacrifício dos lactentes inoculados seria realizado aos sete dias, como sugerido por SILVA (2000) para vírus de rua. No entanto os vírus fixos apresentam períodos de incubação mais curtos e foi verificado, nos testes preliminares, que aos sete dias já ocorria morte de grande número de animais. Desta forma, os sacrifícios foram realizados aos cinco dias.

Os camundongos lactentes foram sacrificados com CO_2 e os cérebros foram submetidos à IFD.

Os animais com 11 a 15 g foram acompanhados, após a inoculação, por 21 dias e contados e avaliados diariamente para a evolução de sintomas de Raiva, sendo aplicados “end-points” humanitários, como utilizado rotineiramente no laboratório.

Os resultados foram registrados em ficha padronizada de ensaio.

3.3.2. Inoculação em cultivo celular

Visando determinar a sensibilidade deste sistema à quantidade de CCID50 de vírus como prova de detecção de vírus rábico infeccioso residual, foram realizadas diluições em Meio de Dulbeco com 2,5% de soro fetal bovino, contendo 10; 1,0; 0,1 e 0,05 CCID50, do vírus lote PV-01/04, em placas de 96 orifícios, ficando 90 μ l em cada poço. A seguir, foram adicionados 50 μ l de suspensão contendo 6×10^5

células BHK-21/ml a cada poço. As placas foram inoculadas e incubadas entre 36,5 e 37 °C em estufa com 5% CO₂ por 48 h. Após isto, foram submetidas à fixação e ao teste de IFD como descrito no manuscrito 1 (MOURA et al., 2008).

3.4. Análise Estatística

Os testes foram realizados pelo menos 4 vezes em cada grupo, os títulos foram calculados pelo método de probitos utilizando o programa do EDQM para análise estatística de dados originados de ensaios biológicos de diluição (CombiStats, COUNCIL OF EUROPE, 2008-b). Foram ainda calculadas as porcentagens de positividade por diluições e obtidas as DL50 reais por diluição e suas médias para serem comparadas com as DL50 teóricas.

O ensaio utilizando camundongos adultos foi considerado o teste padrão. Comparações entre os títulos obtidos pelos grupos camundongos adultos (CA), camundongos lactentes (CL) e cultura de células (CC) foram feitas por análise de variância (ANOVA) com a finalidade de testar se houve diferença significativa entre as médias ($p=0,05$). Foram ainda avaliadas:

- A correlação entre a porcentagem de positividade média por diluição;
- A correlação entre o número de DL50 teórico e o obtido por diluição;

4. Resultados

4.1. Títulos dos testes em camundongos adultos e camundongos lactentes e precisão intermediária

A tabela 1 apresenta: os títulos individuais em logaritmo por teste ($n=20$), as médias, os intervalos de confiança de 95% e os coeficientes de variação (CV %), que expressam a precisão intermediária (variação inter-ensaios) para o ensaio de titulação viral do lote PV-01/04 nos grupos CL ($n=10$) e CA ($n=10$).

No grupo CL, o título, em logaritmo, variou de 4,45 a 5,41, o intervalo de confiança de 95% foi 4,36 – 5,90 e a precisão intermediária foi 6,41%. Para o grupo CA, o título variou de 4,59 a 5,12, o intervalo de confiança foi 4,63-5,11 e a precisão intermediária foi 3,08%. A precisão intermediária geral entre os dois grupos foi 4,93%.

4.1.1 Exatidão

O grupo CL apresentou uma exatidão, medida através do percentual de recuperação determinado como descrito por PLIKAYTIS et al., (2000), de 100,88% na determinação do título quando a média dos resultados foi comparada com a média de CA, quando os resultados deste grupo foram considerados como valor de referência por ser a técnica padrão.

A Tabela 2 demonstra os resultados da análise de variância (ANOVA). Não houve diferença significativa entre as médias ($F = 0,1515$; $p=0,7017$).

TABELA 1 - Títulos em logaritmo obtidos para vírus rábico lote PV-01/04 determinado por via i.c. em camundongos com 11 a 14 g com intervalo de confiança de 95%, (n = 20).

Teste	10 Lactentes			20 Adultos		
	Título*	LIC	LSC	Título*	LIC	LSC
1	5,17	4,78	5,56	5,12	4,88	5,35
2	5,30	4,65	5,66	4,88	4,65	5,12
3	4,69	4,33	5,03	4,59	4,34	4,83
4	5,41	5,05	5,78	4,83	4,59	5,06
5	4,99	4,65	5,34	4,95	4,70	5,19
6	4,94	4,59	5,29	4,75	4,51	4,99
7	4,74	4,39	5,09	4,82	4,58	5,06
8	4,55	4,18	4,89	5,03	4,79	5,28
9	4,93	4,59	5,27	4,81	4,57	5,05
10	4,45	4,08	4,81	4,96	4,72	5,20
Média	4,92	4,53	5,27	4,87	4,63	5,11
CV %	6,41			3,08		

* Logaritmo

TABELA 2 - Anova fator único comparando resultados dos grupos de animais

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
CA	10	48,74	4,87	0,023
CL	10	49,17	4,92	0,099

ANOVA							
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico	
Entre grupos	0,0092	1	0,0092	0,1515	0,7017	4,4139	
Dentro dos grupos	1,0984	18	0,0610				
Total	1,1077	19					

4.2. Títulos dos testes em cultura de células e precisão intermediária

A tabela 3 apresenta: os títulos individuais em logaritmo por teste (n = 32), as médias, os intervalos de confiança de 95% e os coeficientes de variação percentual (CV %) que expressam a precisão intermediária (variação inter-ensaios) para o ensaio de titulação viral do lote PV-01/04 no grupo CC. O título variou de 2,92 a 5,59, os CV % foram 13,31% no teste 1; 24,18% no teste 2; 3,55% no teste 3 e 5,88% no teste 4. A média geral do título foi 4,13 (Intervalo de confiança 3,55-4,47) e o CV % geral foi 18,58%. A análise de variância (ANOVA) demonstrou que houve diferenças significativas entre os resultados dos quatro testes (Tabela 4). Assim, os resultados do Teste 4 foram considerados como aberrantes e ao serem eliminados dos cálculos a análise de variância não detectou diferenças significativas entre as médias dos resultados dos Testes 1, 2 e 3 (Tabela. 5).

4.2.1. Exatidão

O grupo CC apresentou uma exatidão, medida através do % de recuperação determinado como descrito por PLIKAYTIS et al., (2000), de 84,53% (considerando os testes de 1 a 4) e 89,25% (considerando apenas os testes de 1 a 3) na determinação do título quando a média dos resultados foi comparada com a média de CA e quando os resultados deste grupo foram considerados como valor de referência por ser a técnica padrão.

TABELA 3 - Títulos logarítmicos para vírus rábico obtido em células BHK-21 pela técnica de anticorpos fluorescentes em 48 horas com intervalo de confiança de 95% (n=32).

Replicata	Teste 1			Teste 2			Teste 3			Teste 4		
	Tit	LIC	LSC									
1	4,09	3,70	4,50	5,58	4,93	6,39	4,81	4,39	5,23	3,35	2,94	3,75
2	3,50	3,10	4,00	5,50	4,86	6,28	4,67	4,26	5,09	2,92	2,52	3,33
3	4,81	4,39	5,23	3,02	2,21	3,67	4,89	4,55	5,24	3,03	2,50	3,47
4	4,67	4,26	5,08	3,80	3,18	4,35	4,80	4,45	5,14	3,31	2,87	3,69
5	4,30	3,89	4,71	4,01	3,42	4,55	4,52	4,18	4,86	3,46	3,06	3,83
6	4,54	4,13	4,95	3,54	2,88	4,11	4,98	4,64	5,32	3,31	2,77	3,77
7	5,19	4,78	5,59	3,56	2,91	4,13	5,00	4,66	5,35	3,29	2,84	3,67
8	3,67	3,24	4,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	3,88	3,28	4,41	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	3,61	2,88	4,26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	4,61	3,88	5,26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	4,26	3,78	4,73	4,13	3,9	4,4	4,80	4,7	4,96	3,22	3,00	3,38
CV %	13,31			24,18			3,55			5,88		

TABELA 4 - Anova fator único comparação dos resultados dos ensaios em cultura de células

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
CC Teste 1	12	50,48	4,21	0,3134
CC Teste 2	7	29,01	4,14	1,0045
CC Teste 3	7	33,67	4,81	0,0292
CC Teste 4	7	22,68	3,24	0,0363

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	8,8589	3	2,9530	8,6782	0,0003	2,9340
Dentro dos grupos	9,8679	29	0,3403			
Total	18,7268	32				

TABELA 5 - Anova células excluindo teste 4.

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
CC Teste 1	12	50,48	4,21	0,3134
CC Teste 2	7	29,01	4,14	1,0045
CC Teste 3	7	33,67	4,81	0,0292

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2,0254	2	1,0127	2,4137	0,1118	3,4221
Dentro dos grupos	9,6500	23	0,4196			
Total	11,6754	25				

4.3. Comparações entre os grupos

A Tabela 6 apresenta as percentagens médias de positividade por diluição para os grupos CA e CL e a Tabela 7 a percentagem média de positividade do grupo CC. A Tabela 8 apresenta os coeficientes de correlação entre as porcentagens de positividade entre os grupos CA, CL e CC e o nível de significância estatística.

TABELA 6 - Comparação entre a percentagem média de positividade por diluição nos grupos Camundongos de 11 a 15 g e Camundongos Lactentes

<i>Diluição</i>	<i>CA</i>	<i>CL</i>
	<i>% positividade</i>	<i>% positividade</i>
-4,0	87,00	87,50
-4,6	65,50	64,75
-5,3	22,50	30,27
-5,9	9,00	11,22

TABELA 7 - Porcentagem média de positividade por diluição em Cultura de Células

Diluição	% positividade
-3,3	77,60
-4,3	43,45
-5,3	13,28
-6,3	2,27

TABELA 8 - Coeficientes de correlação de Pearson entre os grupos e grau de significância

	CA	CL	CC
CA	1	.996(**) ^r	.983(*) ^r
CL	.004 ^p	1	.985(*) ^r
CC	.017 ^p	.015 ^p	1

** Correlação é significativa ao nível 0.01 (2-caudas).

* Correlação é significativa ao nível 0.05 (2-caudas).

r – correlação; p – significância

4.3.1. Comparação entre % de positividade de CA e CL

A Figura 1 apresenta o gráfico de dispersão com a linha de tendência entre os resultados de porcentagem de positividade média por diluição entre os grupos CA e CL. O coeficiente de correlação de Pearson foi 0,996 (n = 4) e *p* significativo ao nível 0,01 (*p*=0,037) indicando uma forte correlação entre CA e CL (Tabela 8).

4.3.2. Comparação entre % de positividade de CA e CC

A Figura 2 apresenta o gráfico de dispersão com a linha de tendência entre os resultados de porcentagem de positividade média por diluição entre os grupos CA e CC. O coeficiente de correlação de Pearson foi 0,983, indicando uma forte correlação entre CA e CC (n = 4) e *p* significativo ao nível 0,01 (*p*=0,017) (Tabela 8).

4.3.3. Comparação entre % de positividade de CL e CC

A Figura 3 apresenta o gráfico de dispersão com a linha de tendência entre os resultados de porcentagem de positividade média por diluição entre os grupos CL e CC. O coeficiente de correlação de Pearson foi 0,996, indicando uma forte

correlação entre CL e CC, ($n = 4$) e p significativo ao nível 0,01 ($p=0,015$) (Tabela 8).

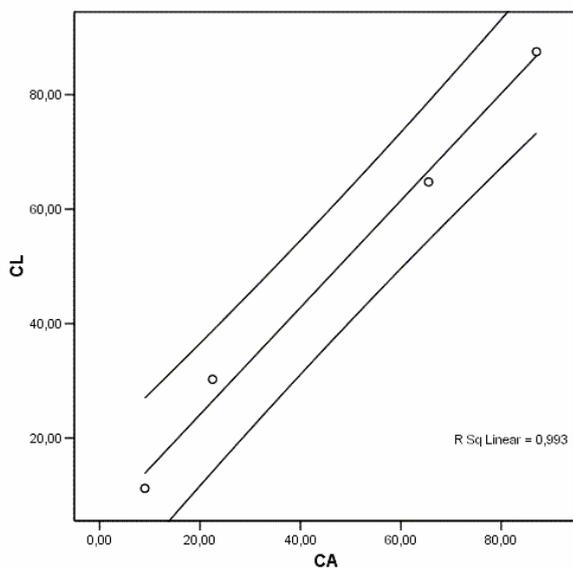


FIGURA 1 - Correlação entre a percentagem média de positividade por diluição entre os grupos CA e CL

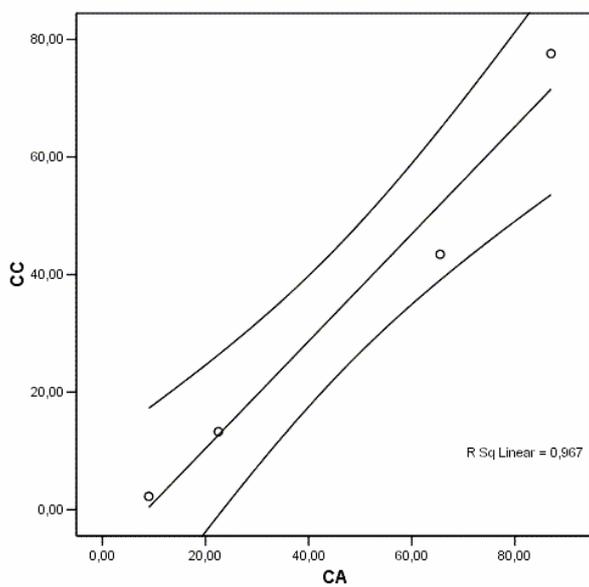


FIGURA 2 - Correlação entre a percentagem média de positividade dos grupos CA e CC.

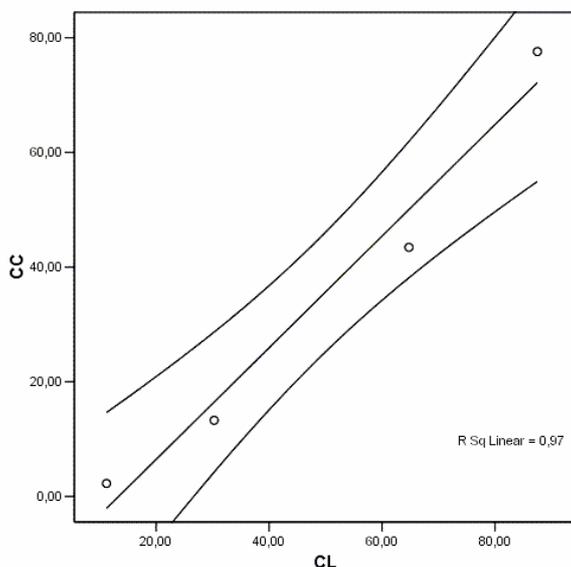


FIGURA 3 - Correlação entre a porcentagem média de positividade dos grupos CL e CC.

4.4. Comparação entre número de DL50 Real e número Teórico

A Tabela 9 apresenta o nº de DL50 teórico e o nº de DL50 real obtidos por diluição nos grupos CA e CL. A tabela 10 apresenta as médias de positividade e o nº de CCID50 teórico e o nº de CCID50 real obtidos por diluição no grupo CC.

TABELA 9 - Comparação entre o nº de DL50 real e teórico por diluição nos grupos Camundongos de 11 a 15 g e Camundongos Lactentes

Diluição	Nº DL50 Teórico	CA	CL
		Nº DL50 Real	Nº DL50 Real
-4,0	10,0	7,89	10,42
-4,6	2,5	1,77	2,33
-5,3	0,5	0,40	0,52
-5,9	0,1	0,09	0,12

TABELA 10 - Nº de CCID50 real e teórico obtidos por diluição no grupo Cultura de Células

Diluição	Nº CCID50 Teórico	Nº CCID50 Real
	-3,3	10,0
-4,3	1,0	1,21
-5,3	0,1	0,13
-6,3	0,01	0,01

A Tabela 11 apresenta os coeficientes de correlação entre o número de DL50 reais e teóricas para os grupos CA, CL, a CCID50 teórica e real para o grupo CC e, os níveis de significância estatística para as correlações.

TABELA 11 - Coeficientes de correlação de Pearson entre os grupos e grau de significância

	DL50 CL	DL50 CA	CCID50	DL50 teórica	CCID50 teórica
DL50 CL	1	1.000(**)	.994(**)	.994(**)	.994(**)
DL50 CA	.000	1	.994(**)	.994(**)	.994(**)
CCID50	.006	.006	1	.993(**)	1.000(**)
DL50 teórica	.006	.006	.007	1	.993(**)
CCID50 teórica	.006	.006	.000	.007	1

** Correlação é significativa ao nível 0.01 (2-caudas).

4.4.1. Comparação entre número de DL50 Real e Teórico grupo CA

A Figura 4 apresenta o gráfico de dispersão com a linha de tendência entre o nº de DL50 teórico e o nº de DL50 real obtido por diluição para o grupo CA. O coeficiente de correlação de Pearson foi 0,994, indicando uma forte correlação entre o nº de DL50 teórico e o nº real obtido por diluição no grupo CA, (n = 4) com p significativo ao nível 0,01 ($p=0,006$) (Tabela 11).

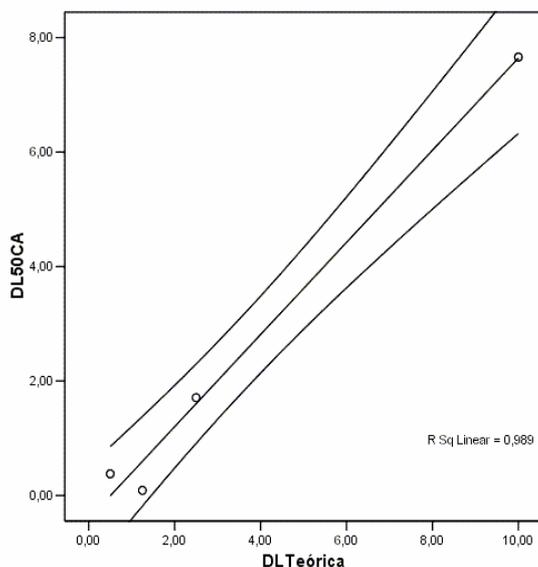


FIGURA 4 - Correlação entre o nº de DL50 teórico e o real obtido no ensaio para o grupo CA.

4.4.2. Comparação entre número de DL50 Real e Teórico no grupo CL

A Figura 5 apresenta o gráfico de dispersão com a linha de tendência entre o nº de DL50 teórico e o nº de DL50 real obtido por diluição para o grupo CL. O

coeficiente de correlação de Pearson foi 0,994, indicando uma forte correlação entre o nº de DL50 teórico e o nº real obtido por diluição no grupo CL, (n = 4) com p significativo ao nível 0,01 ($p=0,006$) (Tabela 11).

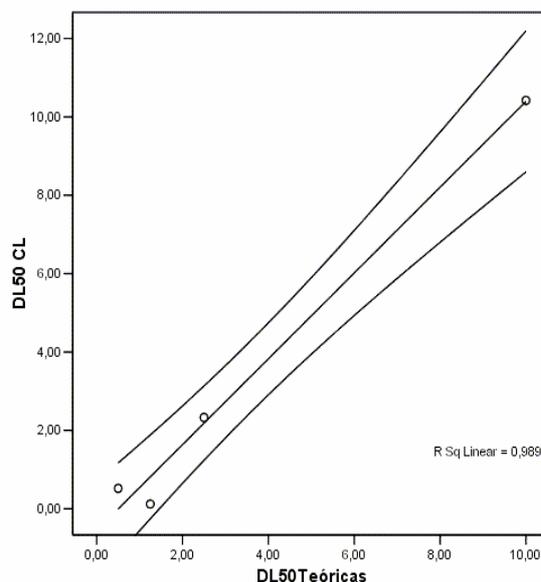


FIGURA 5 - Correlação entre o nº de DL50 teórico e o real obtido no ensaio para o grupo de CL.

4.4.3. Comparação entre número de DL50 Real e Teórico grupo CC

A Figura 6 apresenta o gráfico de dispersão com a linha de tendência entre o nº de CCID50 teórico e o nº de CCID50 real obtido por diluição para o grupo CC. O coeficiente de correlação de Pearson foi 1,000, indicando uma perfeita correlação entre o nº de CCID50 teórico e o nº real obtido por diluição no grupo CC, (n = 4) com p significativo ao nível 0,01 ($p=0,000$) (Tabela 11).

4.5. Comparação entre ensaios *in vivo* e *in vitro*

A análise de variância (ANOVA) demonstrou que houve diferenças significativas ($p=0,0019$) entre os resultados dos ensaios *in vivo* (CA e CC) e *in vitro* (CC) (Tabela 12). O quarto ensaio do grupo CC não foi incluído na comparação por ter sido considerado aberrante na Análise de variância.

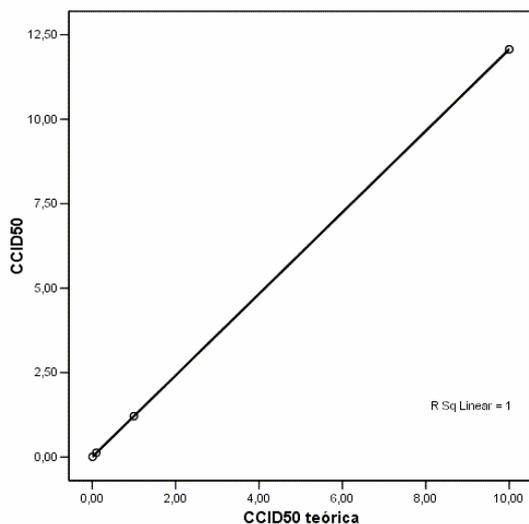


FIGURA 6 - Correlação entre o nº de CCID50 teórico e o real obtido no ensaio para o grupo de CC

TABELA 12 - ANOVA comparando ensaios em animais e em cultura de células (excluindo teste 4)

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
CA	10	48,74	4,87	0,0226
CL	10	49,17	4,92	0,0995
CC Teste 1	12	50,48	4,21	0,3134
CC Teste 2	7	29,01	4,14	1,0045
CC Teste 3	7	33,67	4,81	0,0292

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>Gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	5,3683	4	1,342	5,1194	0,0019	2,6000
Dentro dos grupos	10,7485	41	0,262			
Total	16,1168	45				

TABELA 13 - Coeficiente de variação entre as porcentagens de positividade média obtidas entre os grupos CA, CL e CC.

<i>Diluição</i>	<i>CA</i>	<i>CL</i>	<i>CV %¹</i>	<i>CC</i>	<i>CV %²</i>
1,00	87,00	87,50	0,41	77,60	6,63
2,00	65,50	64,75	0,81	43,45	21,62
3,00	22,50	30,27	20,83	13,28	38,63
4,00	9,00	11,22	15,54	2,27	62,15

1 – Coeficiente de variação entre CA e CL

2 – Coeficiente de variação entre CA, CL e CC

4.6. Sensibilidade de detecção do vírus Rábico

No grupo CL foi possível detectar vírus em diluições contendo até 0,1 DL50, nesta concentração, em geral apenas um camundongo por grupo foi positivo. Também, o grupo CA foi capaz de detectar vírus até a mesma concentração da mesma forma, nestes casos, apenas um animal por grupo foi positivo.

5. Discussão, Conclusões e Perspectivas

A Discussão, Conclusões e Perspectivas do manuscrito 3 são apresentadas nas páginas 78 a 81 do item quatro - DISCUSSÃO.

4. DISCUSSÃO

O controle de imunobiológicos para a Raiva no Brasil segue as monografias da *Ph. Bras.*, que no presente utiliza apenas testes in vivo. A partir de 2008 o INCQS, além de realizar o controle da qualidade das vacinas utilizadas pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI-SVS-MS), passou a ser responsável pela liberação dos lotes analisados, como recomendado pela OMS, em inspeção realizada na instituição neste ano.

O MS adquire vacinas contra a Raiva produzida em células Vero (desde 2003), soro anti-rábico e em menor escala, imunoglobulina anti-rábica humana. Estes produtos são analisados lote a lote e estão previstos os ensaios de potência para vacina contra a Raiva e soro anti-rábico (ensaios de desafio letal) e de verificação da inativação viral (inoculação direta em camundongos).

Os avanços na área de vacinologia se deveram em grande parte à utilização nesta área dos animais de laboratório, que tomou maior importância a partir das descobertas de R. Kock e L. Pasteur no final do século XIX.

A busca pela utilização de ensaios alternativos aos ensaios em animais é uma recomendação que vem sendo adotada mundialmente no campo do controle da qualidade de imunobiológicos, desde a década de 1970.

Neste trabalho estão apresentados os resultados obtidos com a aplicação do conceito dos 3Rs de RUSSELL & BURCH (1959) nos ensaios realizados para controle da qualidade de imunobiológicos para a Raiva preconizados na *Ph. Bras.*

4.1. VALIDAÇÃO DE UM TESTE DE POTÊNCIA DE NEUTRALIZAÇÃO VIRAL EM CÉLULAS BHK-21 PARA IMUNOGLOBULINAS CONTRA RAIVA

Sistemas de garantia da qualidade como as GMP e ISO/IEC requerem o uso de procedimentos analíticos propriamente validados. Embora métodos farmacopeicos não requeiram re-validação, para a liberação de lotes de produtos, certos procedimentos devem ser realizados para garantir que os métodos são aplicáveis na hora de sua utilização. Pode ser necessário confirmar a precisão do método ou a sua confiabilidade em atingir os níveis de detecção do método validado (Australian Government, 2006). Validação é o processo pelo qual a confiabilidade,

uma medida objetiva da reprodutibilidade intra e inter-laboratorial (Balls et al., 1990), e a sua relevância são avaliadas com o objetivo de dar suporte a um uso específico (NIEHS, 1997; Frazier, 1990). Um método é considerado validado quando suas características de performance, vantagens e limitações foram adequadamente determinadas para um propósito específico (Balls et al., 1990). Não há níveis de reprodutibilidade ótimos ou mínimos ou associados ao evento de interesse que deverão ser alcançados para uma validação de sucesso. Os níveis de confiabilidade e relevância necessários dependerão das condições sob as quais o teste será usado e o propósito ao qual seus resultados serão aplicados (Robinson, 2003).

Para avaliar a confiabilidade de um método do tipo de ligação, como o EIE, van der ARK et al. (2000), e JACOBSON (1998), adotaram uma variação de 20% ou menos como sendo um bom CV % para repetibilidade. A OMS (1997), descreve que ensaios de ligação tipicamente tem variabilidade entre 5 e 20%, enquanto ensaios *in vitro* ou *in vivo* podem apresentar variabilidade acima de 50%. O presente estudo comparou os resultados obtidos em um estudo realizados em dois laboratórios brasileiros (INCQS e Instituto Butantan) para a validação de um ensaio alternativo *in vitro* para potência de soros e Ig. Os testes demonstraram que o ensaio de potência de neutralização viral (EPNV) apresenta uma variação satisfatória de acordo com os padrões adotados pela OMS (1997), Jacobson (1998) e van der ARK et al. (2000). Para verificar a confiabilidade do método, O INCQS revisou os gráficos de controle do soro de referência em uso na época e obteve um CV % de 78% (n=34) no ensaio de potência em animais e 15,05% (n=20) no EPNV (dados não publicados). Também, a média geométrica geral obtida neste estudo para a DE50 da referência Internacional corroborou com os resultados publicados por FITZGERALD & RASTOGI (1985) and CLIQUET et al. (1998), usando a mesmo material de referência internacional.

4.2. AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE VACINAS CONTRA RAIVA: IMPACTO DE UMA REDUÇÃO NO NÚMERO DE ANIMAIS POR DILUIÇÃO

O ensaio de proteção de camundongos NIH continua sendo o único ensaio de potência aceito pela OMS para a liberação de lotes de vacina contra Raiva de uso humano (WHO, 2007). Este teste requer um grande número de animais e lhes causa sofrimento substancial. Aplicando o conceito dos 3Rs de Russell & Burch (1959) para o uso de animais de laboratório, nós avaliamos o impacto da redução no número de animais (de dezoito para nove por diluição) sobre a potência estimada de acordo com as recomendações de Hendriksen (et al., 1987; 2004), Weisser e Hachler (1997) e Bruckner et al. (1988, 2003).

Este estudo é uma análise retrospectiva de dados de ensaios de rotina para liberação de lotes de vacina.

Todos os grupos de dados (ST, C1 e C2) apresentaram distribuição normal, quando avaliado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Não foram encontradas diferenças significativas entre as médias dos três grupos de dados quando analisados pelo teste t Student para dados pareados.

O Erro de medição determinado pelo coeficiente de variação intra-amostra (Bland, 2005) entre os grupos ST e C1 e entre os grupos St e C2 foi 25,29% e 23,32% respectivamente. O coeficiente de variação intra-amostra entre os grupos C1 e C2 foi 39,47%. Estes resultados demonstram uma variabilidade aceitável para um ensaio *in vivo*, uma vez que segundo a OMS (WHO, 1997^a), ensaios *in vivo* e *in vitro* podem apresentar variabilidade maior que 50%.

Quando a vacina de referência foi avaliada, não houve aumento significativo as médias das DE50 (ST = 20,48; C1 = 21,26 e C2 = 22,42). Entretanto houve um aumento significativo na amplitude do intervalo de confiança da DE50 (C1 = 73,75 e C2 = 36,92%), como consequência da redução na precisão da determinação quando a DE50 da vacina de referência foi calculada usando nove animais por diluição. Como o resultado da vacina de referência pode invalidar um ensaio inteiro se alguns critérios não forem atingidos, (e.g. linearidade na curva dose

resposta), visando evitar uma perda adicional na precisão do teste, decidimos continuar a usar dezoito animais por diluição para a vacina de referência no ensaio NIH. Embora a redução no número de animais tenha sido testada apenas nos animais da vacina teste no presente estudo, como indicado pela média das DE50, a redução pode também ser aplicada à vacina de referência.

O % CV para a DE50 da vacina de referência foi 43,09% em 33 de 38 ensaios no presente estudo. No estudo publicado por Bruckner et al. (2003), o desvio padrão em 24 testes NIH realizados com a mesma vacina de referência foi 45% e em 38 testes, foi 115%. Como mencionado anteriormente, segundo a OMS (WHO, 1997^a), ensaios *in vivo* e *in vitro* podem apresentar variabilidade maior que 50%.

Os resultados de ST menos resultados de C1 e de C2, quando tratados como medidas repetidas, não apresentaram tendências significativas para que houvesse mudanças na quantidade de variação devido ao incremento dos valores medidos em nenhum dos dois grupos de comparações (Bland & Altman, 1996). Aplicando a abordagem de identidade como preconizado por Petersen et al. (1997), os resultados das medidas repetidas não desviram umas das outras mais do que a imprecisão inerente ao ensaio, assumindo a distribuição normal de resultados, como determinado pelo teste de qui-quadrado.

Isto demonstra a boa reprodutibilidade dos resultados entre os grupos ST e C1 e entre os grupos ST e C2.

O Coeficiente de Concordância de Correlação demonstrou uma “Concordância Excelente” entre os resultados dos grupos ST e C1 e entre os grupos ST e C2, quando classificado de acordo com Warke et al. (2001), o que demonstrou que o ensaio NIH usando 9 animais por diluição pode prover resultados comparáveis aos do Teste NIH padrão.

O índice kappa de Cohen dos resultados categorizados de potência (Aprovado ou Reprovado) entre os grupos ST e C1 e entre os grupos ST e C2 demonstrou ‘Concordância Substancial’ (Landis & Koch, 1977). Foi observado um número de falso negativos nos grupos C1 (5,4%) e C2 (4,7%) e uma discreta ocorrência de falso positivos nos grupos C1 (0,9%) e C2 (0,5%).

Segundo a OMS (WHO, 1997b), deve haver menos de 10% de conclusões contraditórias entre um ensaio alternativo com um método simplificado e um teste padrão. A incidência de conclusões contraditórias no grupo C1 foi 6,3% e 5,2% no grupo C2, ambos significativamente menores do que 10%. De acordo com nosso Procedimento Operacional Padrão, todas as amostras que sejam reprovadas no ensaio devem ser retestadas pelo menos uma vez e os resultados devem ser combinados pela média geométrica ponderada (MGP). A MGP entre dois valores de potência será considerada, e se a MGP for satisfatória, a amostra é aprovada. Se a média não for satisfatória, uma nova repetição é realizada e a MGP dos três resultados é considerada como o resultado final.

A precisão dos valores de potência é indicada pelos limites de confiança de 95% (Hendriksen et al., 1987). A *Ph. Eur.* e a WHO recomendam uma faixa de 25–400% para os limites de confiança no ensaio NIH (Council of Europe, 2008b; WHO, 2007). No presente estudo, 4 em 51 ensaios (7,84%) no grupo C1 e 5 em 51 ensaios no grupo C2 (9,80%) foram invalidados neste requerimento (25%–400%). Portanto, 8,8% (média) dos ensaios foram considerados inválidos como consequência da redução do número de animais testados. Estes resultados estão de acordo com os obtidos com o ensaio padrão no INCQS nos últimos cinco anos (6,16% de ensaios inválidos). Estes resultados também concordaram com os descritos por Hendriksen et al. (1987).

Weisser and Hechler (1997), em uma revisão crítica da monografia de vacina contra Raiva de uso humano usando o conceito dos 3Rs, sugeriram que em vez de se adotar a faixa de 25-400% para o intervalo de confiança, seria mais útil estipular-se um valor mínimo. Este valor deveria ser excedido pelo limite inferior de confiança para garantir uma potência satisfatória, como no caso de outros ensaios de potência (e.g., difteria, tétano). Este valor mínimo seria derivado do atual requerimento e seria 0,625 UI/dose para vacinas de cultivo celular (25% of 2.5 IU/dose). No presente estudo, quando este conceito foi aplicado, todos os ensaios de potência que foram considerados inválidos, mesmo apresentando resultados de potência satisfatórios passaram a ser considerados válidos. Isto

demonstra como a adoção deste conceito poderia evitar reteste de vacinas que já apresentaram o requerimento mínimo de potência no primeiro ensaio.

A incidência de ensaios estatisticamente inválidos devido à não-linearidade e não-parallelismo foi 11,76% (6 em 51) para ambos os grupos C1 e C2. Estes resultados estão de acordo com a recomendação da OMS de menos de 20% de resultados rejeitados devido tanto à linearidade quanto parallelismo (WHO, 1997b). Hendriksen et al. (1987) reportaram 3 em 38 (7.89%) ensaios inválidos devido ao não-parallelismo ou não-linearidade em seu estudo avaliando reduções no número de animais de 20 para 12 visando determinar a potência de vacina de componente diftérico

Ensaio inválidos devido a estes desvios são freqüentes no ensaio padrão NIH. No INCQS nos últimos cinco anos, 7,84% dos testes foram inválidos devido à não-linearidade ou não-parallelismo. Portanto, o aumento real no número de ensaios inválidos foi 3,92%. Como um exemplo prático, se 18 animais forem usados por diluição (testando três diluições = 54 animais por vacina), para cada 100 ensaios testando uma única amostra de vacina, baseado em uma taxa de ensaios inválidos de 7,84%, um total de 5.822 camundongos seria usado. Se o número de camundongos fosse reduzido para 9 animais por diluição (testando três diluições = 27 camundongos por vacina), para cada 100 ensaios testando uma única vacina, baseado em uma taxa de ensaios inválidos de 11,76%, um total de 3.018 animais deveria ser usado para a vacina teste.

Isto representa uma redução de aproximadamente 48% no número de camundongos usados. Aplicando isto ao teste utilizando 16 camundongos por diluição (também considerando uma taxa de 7,8% de taxa de invalidação), esta redução seria de cerca de 42% para as vacinas teste.

Bruckner et al. (1988) publicou que não seria possível reduzir o número de camundongos usados no ensaio de NIH para menos do que 10 porque esta redução poderia levar a resultados que seriam significativamente menos precisos. Weisser and Hechler (1997) sugeriram que o número de animais necessários para o teste deveria ser deixado aberto e que cada laboratório poderia determinar ou

confirmar o número de animais requerido para satisfazer o requerimento de ensaio válido. Adicionalmente Weisser e Hechler (1997) descreveram, que baseado no ensaio NIH para vacinas veterinárias, este número poderia ser reduzido para 10 animais por diluição.

Os requerimentos para ensaio válido para vacinas veterinárias são os mesmos dos da vacina de uso humano, exceto que o requerimento mínimo de potência para vacinas de uso humano (2.5 IU/dose) é maior do que o usado para vacinas veterinárias (1.0 IU/dose) (Weisser & Hechler, 1997).

Apesar da existência de um teste NIH de diluição única, ele apenas determina se uma vacina tem potência significativamente maior do que o requerimento mínimo. O ensaio de diluição única NIH não provê informação completa da validade de cada determinação de potência individual, e apenas é recomendado para laboratórios com experiência em realizar ensaio NIH de doses múltiplas. Além disto, se um lote de vacina falha em atingir as especificações para o teste simplificado, o ensaio de potência padrão deve ser realizado (WHO, 2007). Entretanto, o teste simplificado é particularmente útil para testar múltiplos lotes de vacina em um curto espaço de tempo. a OMS recomenda que vários pré-requisitos e condições devem ser considerados antes de adotar o ensaio simplificado de dose única (WHO, 2007). Entretanto, devido a sua falta de precisão, o mínimo requerimento para as vacinas testadas pelo ensaio simplificado é maior do que para as vacinas testadas pelo ensaio padrão NIH (Wilbur & Aubert, 1996). Bruckner et al., (2003) afirmaram que deve ser reconhecido que este esquema de teste de vacinas não pode ser aplicado a todas as vacinas contra Raiva no mercado.

Os resultados deste estudo indicam que a substituição do ensaio padrão NIH por uma variante do ensaio usando apenas nove animais por diluição da vacina parece ser factível para o ensaio de rotina. O teste usando o número menor de animais provê resultados equivalentes ao ensaio NIH padrão que provê validação estatística completa de cada determinação de potência individual.

Se aplicado, poderá resultar em 42-48% de redução no número de camundongos usados, mesmo considerando um ligeiro incremento na incidência de ensaios inválidos.

Os resultados também demonstraram que a adoção de um limite de confiança de 25% da potência estimada ao invés de uma faixa para o intervalo de confiança, como sugerido por Weisser e Hechler (1997) e similar ao que já foi estabelecido para testes comparáveis de potência (e.g. difteria, tétano, pertussis), evitaria que vacinas que já tivessem atingido o requerimento mínimo de potência fossem retestadas.

4.3. MÉTODO REDUZIDO PARA DETECÇÃO DE VÍRUS INFECTIVO RESIDUAL PARA VACINAS CONTRA RAIVA

Os “Requirements for Biological Substances” para produção de vacina contra Raiva de 1980 e 1987 (WHO, 1980 e 1987), recomendam como teste para detecção de vírus infectivo residual que cada “bulk” seja testado em camundongos para avaliar a inativação antes da adição dos conservantes e outras substâncias. O teste deverá ser realizado com o material do “bulk” não diluído inoculado por via i.c. em pelo menos 20 camundongos, pesando entre 15 e 20g.

Para vacinas produzidas em cultivo celular o teste *in vitro* de amplificação de vírus rábico recomenda que se utilize a mesma linhagem de células utilizada na vacina. Pelo menos 25 mL de vacina devem ser inoculadas e a cultura deve ser observada por 21 dias, sendo tomadas amostras nos dias 14 e 21 após inoculação, devendo ser inoculados 0,03mL em camundongos de 12-15g por via i.c., estes devem ser observados por 14 dias e a presença viral ser confirmada por IFD.

Para vacinas produzidas em cultivo celular, a *Ph. Eur.* (2008) preconiza que seja realizado nas suspensões de vírus colhidas e inativadas a serem utilizadas na produção do bulk final, o teste *in vitro* de amplificação viral para detecção de vírus rábico infeccioso residual, imediatamente após a inativação ou usando uma amostra congelada imediatamente após à inativação e mantida a -70°C . Também deve ser inoculada uma quantidade de vírus inativado em volume equivalente a não menos do que 25 doses de vacina, em células do mesmo tipo daquelas utilizadas para a produção da vacina, fazer um repique das células após 7 dias e manter a cultura por mais 14 dias e então realizar um exame das culturas celulares para vírus rábico, usando a técnica de IFD. Não deve ser encontrado vírus rábico viável.

Este ensaio em células também está preconizado para avaliação do lote final de vacina. Porém este ensaio é demasiado longo e trabalhoso para que seja utilizado para a detecção de vírus rábico infeccioso residual em laboratórios Oficiais de Controle que apresentam prazos legais para liberação de lotes.

Em 2004, o laboratório Aventis Pasteur noticiou ter encontrado vírus infectivo residual em um lote de VCDH ainda não liberado e em consequência, como medida de segurança, fez um “recall” de outros 7 lotes já distribuídos, produzidos no mesmo período, afetando 24 países. (CDC, 2004). Este fato chamou a atenção das autoridades para o problema, que havia sido considerado sob controle nas vacinas contra Raiva.

Atualmente, o teste em camundongos não é mais recomendado pelas duas normas internacionais (WHO, 2007c, COUNCIL OF EUROPE, 2008), no entanto esta técnica continua prevista na norma brasileira (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2004).

As células BHK-21 são utilizadas em ensaios sorológicos e outros estudos que utilizam cepas de vírus rábico fixo (WEBSTER & CASEY, 1996).

Os resultados obtidos confirmam a maior sensibilidade dos camundongos lactentes ao vírus rábico, uma vez que, com o sacrifício aos cinco dias e subsequente realização de IFD neste grupo de animais, foram detectados títulos equivalentes aos obtidos pelos camundongos de 11 a 15 g observados por 21 dias.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o sistema de teste detecção de vírus infectivo residual para vacinas contra Raiva utilizando CL com sacrifício aos cinco dias e exame dos cérebros por IFD apresenta sensibilidade satisfatória para detecção do vírus Rábico quando comparado ao sistema recomendado pela OMS de 20 CA. O ensaio em CC também demonstrou apresentar sensibilidade satisfatória para detectar o vírus Rábico quando comparado ao sistema CA, embora, os títulos obtidos em CC tenham sido mais baixos que os obtidos em cérebro de camundongos. Isto porém, não interfere na intenção de uso do teste.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5.1. CONCLUSÕES

5.1.1. Ensaio de potência de neutralização viral em células BHK-21 para imunoglobulinas contra Raiva

Concluimos que o EPNV para Raiva em células BHK-21 apresenta satisfatórias linearidade, acurácia, repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade e que o EPNV é um ensaio confiável, rápido e conveniente para avaliar a potência de soro e Ig anti-rábica.

5.1.2. Ensaio de potência de vacinas contra Raiva

Este estudo, baseado em uma avaliação estatística retrospectiva de dados, indica que uma redução de dezoito para nove camundongos por diluição no ensaio NIH parece factível e satisfatório para atingir os requerimentos estatísticos para ensaios válidos. No entanto, estudos futuros devem ser feitos para avaliar a reprodutibilidade deste protocolo alternativo. Como ilustração do impacto desta redução, os 11.556 camundongos usados no presente estudo para determinar a potência de vacinas usando o ensaio NIH padrão seria reduzido para 5.778 usando apenas nove camundongos por diluição para as vacinas teste.

5.1.3. Detecção de vírus rábico infeccioso residual para vacinas contra Raiva

Concluimos que os métodos propostos neste estudo, inoculação em CL e CC podem substituir o método preconizado na *Ph. Bras.* na detecção de vírus rábico infeccioso residual da vacina contra Raiva no exame de rotina, no entanto, para a aceitação dos métodos, um estudo colaborativo com outros laboratórios deve ser realizado para avaliar a reprodutibilidade do ensaio.

5.2. PERSPECTIVAS

5.2.1. Ensaio de potência de neutralização viral em células BHK-21 para imunoglobulinas contra Raiva

- O EPNV já foi apresentado como ensaio alternativo ao ensaio em animais à comissão da *Ph. Bras.* e será incluído em sua próxima edição;
- O ensaio está implantado nas duas Instituições que participaram do estudo;
- Realizar a liberação dos lotes de Ig AR baseado no EPNV a partir de 2009 após sua publicação na *Ph. Bras.*

5.2.2. Ensaio de potência de vacinas contra Raiva e Detecção de vírus rábico infeccioso residual para vacinas contra Raiva

- Avaliar a reprodutibilidade dos ensaios de potência NIH com nove animais por diluição e o ensaio reduzido de detecção de vírus rábico infeccioso residual, através de realização de estudos colaborativos (possivelmente com a participação do Instituto Butantan, Instituto de Tecnologia do Paraná e Laboratório Nacional Agropecuário do MAPA).
- Testar a utilização destes protocolos de ensaios na rotina de liberação de lotes de vacina contra Raiva a partir de 2009;
- Propor a adoção destes protocolos de ensaios à *Ph. Bras.*

5.2.3. Outras vacinas e soros

- Estender estas abordagens de aplicação do conceito dos 3Rs a outras vacinas e soros rotineiramente testados *in vivo* no INCQS.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRÉ, F.E. Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises. **Vaccine**, n. 21, p. 593-595, 2003.
- AOKI, F.Y.; TYRRELL, D.A.; HILL, L.E. Immunogenicity and acceptability of a human diploid cell culture rabies vaccine in volunteers. **The Lancet**, v.1, p.660–2, 1975.
- ARAI, Y.T.; KUZMIN, I.V.; KAMEOKA, Y.; BOTVINKIN, A.D.,. New lyssavirus genotype from the Lesser Mouse-eared Bat (*Myotis blythi*), Kyrgyzstan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p.333–337, 2003.
- ATANASIU, P. Quantitative assay and potency test of rabies serum and immunoglobulin. In: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), **Laboratory Techniques in Rabies**, WHO, Geneva, p. 314-318, 1996.
- AUSTRALIAN GOVERNMENT, - March, 2006. Therapeutic Goods Administration, Finished Product (Medicine) **Analytical Procedure Validation for Complementary Medicines**. Disponível em: <http://www.tga.gov.au/cm/finishval.pdf>. Acesso em 28 fev. 2008.
- BADRANE, H. & TORDO, N. Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders. **Journal of Virology**, v. 75, p. 8096–8104, 2001.
- BALLS, M.; BOTHAM, P.; CORDIER, A.; FUMERO, S.; KAYSER, D.; KOËTER, H.; KOUNDAKJIAN, P.; LINDQUIST, N.G.; MEYER, O.; PIODA, L.; REINHARDT, C.; ROZEMOND, H.; SMYRNIOTIS, T.; SPIELMANN, H.; VAN LOOY, H.; VAN DER VENNE, M-T.; WALUM, E. Report and recommendations of an international workshop on promotion of the regulatory acceptance of validated non-animal toxicity test procedures. **Alternatives to Laboratory Animals (ATLA)** 18, p. 339–344, 1990.
- BARTH, R.; DIDERRICH, G.; WEINMANN, E. NIH test, a problematic method for testing potency of inactivated rabies vaccine. **Vaccine** n. 6, p. 369–377, 1988.
- BARTH, R.; FRANKE, V.; LIN, F.T. Purified chick-embryo cell vaccine for humans, In WHO, **Laboratory Techniques In Rabies**, Chp. 27, 4th ed. WHO, Geneva, p.290-296, 1996.
- BARTH, R.; FRANKE, V.; SELIMOV, M.A. Vnukovo-32 primary hamster kidney cell vaccines for humans. In: **Laboratory Techniques In Rabies**, Chp. 31, 4th ed. WHO, Geneva, p. 310-313, 1996-a.
- BENCHIMOL, J.L. **Dos micróbios aos mosquitos: febre amarela e a revolução pasteuriana no Brasil**. Rio de Janeiro. Ed. FIOCRUZ/Ed. UFRJ. 500 p., 1999.

- BERNARD, K.W.; SMITH, P.W.; KADER, F.J.; MORAN, M.J. Neuroparalytic illness and human diploid cell rabies vaccine. **Journal of American Medical Association**, v. 248, p. 3136–3138, 1982.
- BLAISDELL, J.D. The deadly bite of ancient animals: written evidence for rabies, or the lack thereof, in the ancient Egyptian and Mesopotamian texts. **Veterinary History**, v. 8, p. 22–28, 1994.
- BLAND, J.M.; ALTMAN, D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **Lancet** n. 1, p. 307-310, 1986.
- BLAND, M.J., 2005. **How should I calculate a within-subject coefficient of variation?** Disponível em: <<http://www-users.york.ac.uk/~mb55/meas/cv.htm>> Acesso em: 28 fev. 2008.
- BLAND, M.J.; ALTMAN, D.G. Statistics Notes: Measurement error proportional to the mean, **British Medical Journal** 313, p. 106 (13 July), 1996.
- BLAND, M.J.; KERRY, S.M. Statistics Notes: Weighted comparison of means. **British Medical Journal**, n. 316, p. 129, 1998.
- 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, **Alternatives to Laboratory Animals (ATLA)** 31, p. 429-454, 2003.
- 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** n. 44, p. 853-857, 1988.
- CABASSO, V.J. Local wound treatment and passive immunization. In: Baer, G. M. (Ed.), **The Natural History of Rabies**. 2nd ed. CRC, Florida, p. 551-570, 1991.
- CLIQUET, F.; AUBERT, M.; SAUGNÉ, L. Development of a fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. **Journal of Immunological Methods** 212, p. 79-87, 1998.
- COUNCIL OF EUROPE. Rabies vaccine (inactivated) for veterinary use (Monograph No. 0451). In: **The European Pharmacopoeia**, 6th ed., Strasbourg, France, p. 790-792, 2008a.
- COUNCIL OF EUROPE. Rabies vaccine for human use prepared in cell cultures (Monograph No. 0216). In: **The European Pharmacopoeia**, 6th ed., Strasbourg, France; p. 836-838, 2008b.

- COUNCIL OF EUROPE. Assays depending upon quantal responses. (Chapter - General texts - 4). In: **The European Pharmacopoeia**, 6th ed., Strasbourg, France, p. 580-582, 2008c.
- BOTVINKIN, A.D.; POLESCHUK, E.M.; KUZMIN, I.V.; BORISOVA, T.I.; GAZARYAN S.V.; YAGER, P.; RUPPRECHT, C. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p.1623–1625, 2003.
- BRINK, E.W., HINMAN, A.R. The vaccine injury compensation act: The new law and you. **Contemporary Pediatrics**, v. 6(3): p. 28–32, 1989.
- CABASSO, V.J.; LOOFBOUROW, J.C.; ROBY, R.E.; ANUSKIEWICZ, W., Rabies immune globulin of human origin: preparation and dosage determination in non-exposed volunteer subjects. **Bulletin of World Health Organization**, v. 45, p. 303–315, 1971.
- CASADEVALL. A. Short analytical review. Passive antibody therapies: progress and continuing challenges. **Clinical Immunology** n. 93, p. 5–15, 1999.
- CASTLE, P. Alternatives to animal testing: achievements and recent developments in the European Pharmacopoeia. **Developments in Biological Standardization**, v. 86, p. 21-9, 1996.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL, CDC, 2008-a. USA. **Common questions about vaccine side effects**. Disponível em: www.in.gov/isdh/files/Vaccine_Side_Effects.pdf> Acesso em: 02 dez. 2008.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL, CDC, 2008-b. USA. **History of vaccines safety**, site: disponível em: <http://www.cdc.gov/vaccinesafety/basic/history.htm#ncvia>> Acesso em: 04 dez. 2008.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL, CDC. Systemic allergic reactions following immunization with human diploid cell rabies vaccine. **Morbidity and Mortality Weekly Report**; v. 33, p. 185–187, 1984.
- CHEN, R.T.; HIBBS, B. Vaccine safety: Current and future challenges. **Pediatric Annals**; n. 27 v. 7, p. 445–455, 1998.
- CHRISTIANSEN, G.D. **Biotechnology: Quality Assurance and Validation**, Edited by Avis, K.E.; Wagner, C.M.; Wu, V.L. CRC Press, ISBN 1574910892, 9781574910896. p. 33-71, 1998.
- CLASSEN, J.B., 2008. Type 1 Diabetes Versus Type 2 Diabetes/Metabolic Syndrome, Opposite Extremes of an Immune Spectrum Disorder Induced by Vaccines. **The Open Endocrinology Journal**, 2, p. 9-15. Disponível em: <http://www.vaccines.net/newpage11.htm>> Acesso em: 04 dez. 2008.

- COUNCIL OF EUROPE, 2008-a. Vaccines for human use. In: **The European Pharmacopoeia**. 6th ed. Strasbourg. France; p. 705-707.
- COUNCIL OF EUROPE, 2008-b. **CombiStats v4.0**, EDQM –, <www.combistats.eu>.
- COUNCIL OF EUROPE. 2008-c. Assays depending upon quantal responses. (Chapter - General texts - 4). In: **The European Pharmacopoeia**, 6th ed., Strasbourg, France, pp. 580-582.
- COX, J.H.; SCHNEIDER, L.G. Prophylactic immunization of humans against rabies by intradermal inoculation of human diploid cell culture vaccine. **Journal of Clinical Microbiology**; v. 3, p.96–101, 1976.
- DEAN, D.J.; ABELSETH, M.K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: **Laboratory Techniques In Rabies**, Chp. 7, 4th ed. WHO, Geneva, p. 88-95, 1996.
- DELMAS, O.; HOLMES, E.C.; TALBI, C.; LARROUS, F.; DACHEUX, L. BOUCHIER, C.; BOURHY, H. Genomic Diversity and Evolution of the Lyssaviruses. **PLoS ONE** 3(4): e2057 doi:10.1371/journal.pone.0002057, 2008.
- DOBBELAER, R. European Pharmacopoeia and EMEA. In: International Conference Proceedings – Biologicals Beyond 2000. **Pharmeuropa**, Special Issue, p. 263-264, 2000.
- DREESEN, D.W.; BERNARD, K.W.; PARKER, R.A.; DEUTSCH, A.J.; BROWN, J. Immune complex-like disease in 23 persons following a booster dose of rabies human diploid cell vaccine. **Vaccine**, v. 4, p. 45–49, 1986.
- DREESEN, D.W. A global review of rabies vaccines for human use. **Vaccine**, v. 15, Suppl. p. 52-56, 1997.
- ELLENBERG, S.S.; CHEN, R.T. The complicated task of monitoring vaccine safety. **Public Health Reports**; n.112, v.1, p. 10–20, 1997.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Fascículo 5 – 4a ed. parte II – **Vacina Contra Raiva uso Humano**, monografia 120, 2004.
- FENNER, F.; HENDERSON, D.A.; ARITA, I.; JEZEK, Z.; LADNY, I.D. **Smallpox and its Eradication**. Geneva: World Health Organization, 1988.
- FERMI, C. Immunisierung der Muriden mit wut – und mit normaler Nervensubstanz gegen die nachfolgende subkutane Infection von Strasse Virus, **Z. Hyg. Infektioskr.** 58, 221, 1908.
- FESTING, M.F. Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments. **Laboratory Animals**, v.28, p. 212-221, 1994.

- FITZGERALD, E.A.; RASTOGI, S.C. A collaborative study to establish an International Standard Rabies immunoglobulin of human origin. **Journal of Biological Standardization**, n. 13, p. 327-333, 1985.
- FITZGERALD, E.A. Potency test for anti-rabies serum and Immunoglobulin In: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), **Laboratory Techniques in Rabies**, WHO, Geneva, p. 417-422, 1996.
- FITZGERALD, E.A.; GALLAGHER, M.; HUNTER, W.S.; SELIGMANN, Jr., E.B. Use of the antibody assay in immunized mice for the determination of rabies vaccine potency. Joint WHO/IABS Symposium on the Standardization of rabies vaccines for human use produced in cell culture. **Develops in Biological Standardization**. v. 40, 183-186. Karger, Basel, 1978.
- FREED, G.L.; KATZ, S.L.; CLARK, S.J. Safety of vaccinations: Miss America, the media, and public health. **Journal of the American Medical Association**, v. 276 (23): p.1869–1872, 1996.
- FOOKS, A.R.; BROOKES, S.M.; JOHNSON, N.; MCELHINNEY, L.M.; HUTSON, A.M. European bat lyssaviruses: an emerging zoonosis. **Epidemiology and Infections**, v.131, p. 1029–1039, 2003.
- FUENZALIDA, E.; PALACIOS, R. Un método mejorado en la preparación de la vacuna antirábica. **Boletín del Instituto de Bacteriología de Chile**, n. 8, p. 3-10, 1955.
- FUENZALIDA, E.; PALACIOS, R.; BORGÑO, J. M. Antirabies antibody response in man to vaccine made from infected suckling mouse brains. **Bulletin of World Health Organization**, v. 30: p. 431-436., 1964.
- GALAZKA, A.M.; LAUER B.A.; HENDERSON, R.H. & KEJA, J. Indications and contraindications for vaccines used in the Expanded Programme on Immunization. **Bulletin of World Health Organization**, 62: p. 357, 1984.
- GRIFFITHS, E. Assuring the quality of vaccines: regulatory requirements for licensing and batch release. In: **Methods in molecular medicine: Vaccine protocols**. Ed. Robison, A., Farrar, G. and Wiblin, C. Humana Press, USA., p. 269-288, 1996.
- GRUNDBACHER, F.J. Behring's discovery of diphtheria and tetanus antitoxins. **Immunology Today**, n. 13, v. 5, p. 188-189, 1992.
- GUILLEMIN, F.; TIXIER, G.; SOULEBOT, J.P.; CHAPPUIS, G. Comparison de deux methods de titrage des anticorps antirabiques neutralizants. **Journal of Biological Standardization**, n. 9, p. 147-156, 1981a.

- GUILLEMIN, F.; TIXIER, G.; SOULEBOT, J.P.; CHAPPUIS, G. Résultats comparés des anticorps antirabiques per deux méthodes utilisant l'immunofluorescence. **Journal of Biological Standardization**, n. 9, p. 157-160, 1981b.
- HABEL, K. Evaluation of a mouse test for the standardization of the immunizing power of antirabies vaccine, **Public Health Report**, v. 55, p.1473, 1940.
- HABEL, K. & KOPROWSKI, H., Laboratory data supporting the clinical trial of antirabies serum in persons bitten by a rabid wolf, **Bulletin of World Health Organization**, v. 13, p. 773, 1955.
- HALDER, M. Three Rs Potential in the Development and Quality Control of Immunobiologicals. **Alternatives to Animal Testing and Experimentation**, v. 18, supl 1, 2001.
- HANNA, J.N.; CARNEY, I.K.; SMITH, G.A.; TANNENBERG, A.E.; DEVERILL, J.E.; BOTHA, J.A.; SERAFIN, I.L.; HARROWER, B.J.; FITZPATRICK, P.F.; SEARLE, J.W. Australian bat lyssavirus infection: a second human case, with a long incubation period. **The Medical Journal of Australia**, v. 172, p. 597–599, 2000.
- HAUPT, W. Rabies – risk of exposure and current trends in prevention of human cases. **Vaccine**, v. 17, p.1742–1749, 1999.
- 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 Pharmacopœia. **Journal of Biological Standardization**, n. 15, p. 353-362, 1987.
- HENDRIKSEN, C.F.M.; SPIESER, J.M.; AKKERMANS, A.; BALLS, M.; BRUCKNER, L.; CUSSLER, K.; DAAS, A.; DESCAMPS, J.; DOBBELAER, R.; FENTEM, J.; HALDER, M.; van der KAMP, M.; LUCKEN, R.; MILSTIEN, J.; SESARDIC, D.; STRAUGHAN, D.; VALADARES, A., 1998. Validation of alternative methods for the potency testing of vaccines. **Alternatives to Laboratory Animals (ATLA)**, n. 26, p. 747-761, 1998.
- HENDRIKSEN, C.F.M., 1991. Some considerations on the use of animals in vaccine production and quality control. In: **Perspectives on medical research**, vol. 3. Safer Medicine Campaign. Disponível em: http://www.curedisease.net/reports/Perspectives/vol_3_1991/vaccine_prod.html>. Acesso em: 03 dez. 2008.
- HENDRIKSEN, C.F.M. & van der GUN, J. Animal models and alternatives in the quality control of vaccines: are in vitro methods or in vivo methods the scientific equivalent of the emperor's clothes. **Alternatives to Laboratory Animals (ATLA)**, v. 23, p. 61-73, 1995.

- HENDRIKSEN, C.F.M. A short history of the use of animals in vaccine development and quality control. In F. Brown, K. Cussler and C. F. M. Hendriksen (eds.), Replacement, reduction and refinement of animal experiments in the development and control of biological products (3-10). **Developments in Biological Standardization**, 86. Basel: S. Karger AG, 1996.
- HENDRIKSEN, C.F.M. Reduction of numbers of animals used in the Quality Control of Biologicals. **Alternatives to Laboratory Animals (ATLA)**, n. 32, v. 2, p. 53-58, 2004.
- HENDRIKSEN, C.F.M. Animal models in Vaccinology. In: **Handbook of Laboratory Animal Science**, 2nd ed. Vol. III Animal Models. Hau J & van Hoosier G.L.Jr. eds.. CRC Press New York, p.1-15, 2005.
- HENDRIKSEN, C.F.M. Towards eliminating the use of animals for regulatory required vaccine quality control. **Alternatives to Animal Testing and Experimentation (ALTEX)**; v. 23, p. 187-191, 2006.
- HENDRIKSEN, C.F.M. Three Rs achievements in vaccinology, **Alternatives to Animal Testing and Experimentation**, v. 14, Special Issue, p. 575-579, 2007.
- HENDRIKSEN, C.F.M.; ARCINIEGA, J.L.; BRUCKNER, L.; CHEVALIER, M.; COPPENS, E.; DESCAMPS, J.; DUCHÊNE, M.; DUSEK, D.M.; HALDER, M.; KREEFTENBERG, H.; MAES, A.; REDHEAD, K.; RAVETKAR, S.D.; SPIESER, J.M.; SWAM, H. The consistency approach for the quality control of vaccines, **Biologicals**, v. 36, p.73-77, 2008.
- INSTITUTO PASTEUR DE SÃO PAULO, 2008. Site da Instituição. Disponível em: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/historia_01.htm>. Acesso em 15 dez. 2008.
- JACOBSON, R.H. Validation of serological assay for diagnosis of infectious diseases, **Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.**, n. 17 v.2, p. 469-486, 1998.
- JERNE, N.K.; Maaløe, O. Standardization of diphtheria toxoid. Some theoretical and practical considerations. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 2, p. 49-57, 1949.
- JONES, C.; CURIE, F. 1991. Control of components of bacterial polysaccharide vaccines by physical methods. **Biologicals**, v. 19, p. 41-47.
- JUNOD, S.W. FDA Historian Biologics Centennial: **100 Years of Biologics Regulation**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/oc/history/makinghistory/100yearsofbiologics.html>>, Acesso em: 17 set. 2007.
- KAPLAN, M. M. Safety precautions in handling rabies virus. In: **Laboratory Techniques In Rabies**, WHO; 4th ed. Geneva, 476 p., p. 3-8, 1996.

- KING, A.A.; MEREDITH, C.D.; THOMSON, G.R. The biology of southern African lyssavirus variants. **Current Topics of Microbiology Immunology**, v. 187, p. 267–295, 1994.
- KIPLE, K.F. ed. **The Cambridge world history of human disease**. New York: Cambridge University Press, 1993.
- KNOBEL, D.L.; CLEAVELAND, S.; COLEMAN, P.G.; FEVRE, E.M.; MELTZER, M.I.; MIRANDA, M.E.G.; SHAW, A.; ZINSSTAG, J.; MESLIN, F.-X. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. **Bulletin of World Health Organization**, v. 83, p. 360–368, 2005.
- K.N.O.W. Vaccines, Kids Need Options With Vaccines, Parent to parent vaccine danger alert. Disponível em: <<http://www.know-vaccines.org/parent.html>>. Acesso em 04 dez. 2008.
- KOPROWSKI, H., 1996. The mouse inoculation test, in: **Laboratory Techniques In Rabies**, WHO, ed. Kaplan et al., 4th ed., , Geneva, 476p, p80-87, 1996.
- LANDIS J.R.; KOCH G.G. The Measurement of observer agreement for categorical data, **Biometrics** 33, p. 159-174, 1977.
- LIN, L. I-K. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. **Biometrics** 45, pp. 255-68, 1989.
- LIN, L. I-K. Assay validation using the concordance correlation coefficient. **Biometrics** 48, pp. 599-604, 1992.
- LIN, L. I-K. Total deviation index for measuring individual agreement with applications in laboratory performance and bioequivalence. **Statist. Med**, n. 19, p. 255-270, 2000.
- MCVEY, D.S.; GALVIN, J.E.; OLSON, S.C., 2003. A review of the effectiveness of vaccine potency control testing. **International Journal of Parasitology**, n. 33, 5-7- p. 516.
- LANKINEN, K.S.; PASTILA, S.; KILPI, T.; NOHYNEK, H.; MÄKELÄ, P.H.; OLIN, P. Vaccinovigilance in Europe – need for timeliness, standardization and resources. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 82 (110), p. 828-835, 2004.
- LOMBARD, M.; PASTORET, P.P.; MOULIN, A.M. A brief history of vaccines and vaccination. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 26 (1), p. 29-48, 2007.
- LOUIE, R.E.; DOBKIN, M.B.; MEYER, P.; CHIN, B.; ROBY, R.E.; HAMMAR, A.H.; CABASSO, V.J. Measurement of rabies antibody: comparison of the mouse

- neutralization test with the rapid fluorescent focus inhibition test. **Journal of Biological Standardization**, n.3, p. 365-368, 1975.
- McBRIDE, G.B. **Using Statistical Methods for Water Quality Management**. Issues problems and solutions. chp. Cohen's kappa for dichotomous variables. Ed. John Wiley & Sons, New Jersey, pp. 232-235, 2005.
- McKEOWN, T. **The Role of Medicine**. Oxford, Basil Blackwell, 1979.
- MARKUS, H.L.; JOBIM, G.O.; MOURA, M.C.L. Vacina anti-rábica tipo "Fuenzalida" modificada. (Cinco anos de produção e observações). **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.13, p.114-120, 1971.
- MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. eds. 1996. **Laboratory Techniques in Rabies**, 4th ed. Geneva, World Health Organization, 1996.
- METZ, B.; JISKOOT, W.; HENNINK, W.E.; CROMMELIN, D.J.; KERSTEN. G.F.M. Physicochemical and immunochemical techniques predict the quality of diphtheria toxoid vaccines. **Vaccine**, v. 12, p. 156-167, 2003.
- METZ, B.; HENDRIKSEN, C.F.M.; JISKOOT, W.; KERNSTEN, G.F.A. Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. **Vaccine** v. 20, p. 2411-2430, 2002.
- MILLER, E.B. Comparative medicine: American experience with equine tetanus. **Bulletin of the History of Medicine**, v. 57, p. 81-92, 1983.
- MOULIN, A.-M. Philosophy of vaccinology. In: **Vaccinia, vaccination and vaccinology: Jenner, Pasteur and their successors**. Plotkin, S. & Fantini, B. (eds.). Elsevier, Paris, p.17 – 23, 1996.
- MOURA, W.C.; Gallina, N.M.F; Fuches, R.M.M.; Romijn, P.; Leite, J.P.G. Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study, **Journal of Virological Methods**, 154, p. 7-13. doi:10.1016/j.jviromet.2008.09.010, 2008.
- MOURA, W.C.; ARAÚJO, H.P.; ROMIJN, P.C.; CABELLO, P.H.; LEITE, J.P.G., 2009. Potency evaluation of rabies vaccine for human use: the impact of the reduction in the number of animals per dilution, **Journal of Virological Methods**, xxx, p. xxx-xxx, *In press*. doi:10.1016/j.jviromet.2009.01.017, 2009.
- MORTIMER, E. A. Pertussis Vaccine. In: PLOTKIN S. A. & MORTIMER E. A., **Vaccines**. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders company, p. 91-135, 1994.
- NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences), 1997. Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods: **A Report of the ad hoc Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods**, NIH Publication No. 97-3981, NIEHS, Research Triangle Park, North

- Carolina, U.S.A., Disponível em:
<http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/about_docs/validate.pdf> Acesso em: 02 dez. 2008.
- OIE (Office International des Epizooties), 2004. Paris, France – Rabies, in **Manual of standards for diagnostic test and vaccines**. Disponível em:
<http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00044.htm>. Acesso em 04 dez. 2008.
- ORLANS, F.B. In the name of Science. **Issues in responsible animal Experimentation**. Oxford Univ. Press. New York, 1993.
- PARÁ, M. An outbreak of post-vaccinal rabies (rage de laboratoarie) in Fortaleza, Brasil, in 1960. Residual fixed vírus as the etiological agent. **Bulletin of World Health Organization**, n. 33, p. 177-182, 1965.
- PECK, F.B.; POWELL, B.; CULBERTSON, C.G. Duck embryo rabies vaccine. Study of fixed virus vaccine grown in embryonated duck eggs and killed with beta-propiolactone (BPL), **Journal of American Medical Association**, v. 162, p. 1373, 1956.
- PEDIATRICIAN'S GUIDE, 2008. **Immunization timeline**. Disponível em:
<http://www.keepkidshealthy.com/welcome/immunizations/immunization_timeline.html>, Acesso em: 11 nov. 2008.
- PETERSEN, P.H.; STÖCKL, D.; BLAABJERG, O.; PEDERSEN, B.; BIRKEMOSE, E.; THIENPONT, L.; LASSEN, J. F.; KJELDSEN, J., 1997. Graphical interpretation of analytical data from comparison of field method with reference method by use of difference plots. **Clinical Chemistry**, v. 43, n.11, p. 2039-2046, 1997.
- PLIKAYTIS, B.D.; GOLDBLATT, D.; FRASCH, E.; BLONDEAU, C.; BYBEL, M.J.; GIENBINK, G.S.; JONSDOTTIR, I.; KÄYHTY, H.; KONRADSEN, H.B.; MADORE, D.V.; NAHM, M. H.; SCHULMAN, C.A.; HOLDER, P.F.; LEZHAVA, T.; ELIE, C.M.; CARLONE, G.M. An analytical model applied to a multicenter pneumococcal enzyme-linked immunosorbent assay study. **J. Clin. Microbiol.** 38, No. 6, p. 2043-2050, 2000.
- ROBINSON. J. Bioassays – A continuously developing field. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 15, p. 676-678, 2003.
- PLOTKIN, S.A. & MORTIMER, E.A. (Eds). **Vaccines**. Philadelphia WB Saunders, 1994.
- PONTE, C. F. Vacinação, controle de qualidade e produção de vacinas no Brasil a partir de 1960, **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, v. 10 (sup 2), p. 619-53, 2003.

- ROBBINS, F.C. Polio-Historical. In: **Vaccines**. Plotkin, S.A. & Mortimer, E.A., eds. W.B.Saunders Company, Philadelphia, USA p. 98-114, 1988.
- RUDD, R.J.; TRIMARCHI, C.V.; ABELSETH, M.K. Tissue culture technique for routine isolation of street strain rabies virus, **Journal of Clinical microbiology**, Oct. v. 12, n. 4, p. 590-593, 1980.
- RUDD, R.J. & TRIMARCHI, C.V. Comparative of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain rabies virus. **Journal of Clinical microbiology**, Aug. vol 25, no. 8, p. 1456-1458, 1987.
- RUDD, R.J. & TRIMARCHI, C.V. Development and evaluation of an in vitro virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. **Journal of Clinical microbiology**, Nov. v. 27, n. 11, p. 2522-2528, 1989.
- RUSSELL, W.M.S. & BURCH, R.L. **The principles of humane experimental technique**. London: Methuen, 1959.
- RUPPRECHT, C.E.; HANLON, C.A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined, **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2: p.327–343, 2002.
- SANOFI PASTEUR, 2008. **Vaccine research**. Disponível em: <<http://www.sanofipasteur.com/sanofi-pasteur2/front/index.jsp?codeRubrique=31>>. Acesso em: 11 nov. 2008.
- SCHIFF, L.J.; MOORE, J.B.; WISHER, M.H. Lot release: Final product safety testing for biologicals. **BioPharm**, v. 5 (5), p. 36-39, 1992.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/ MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=26698> Acesso em 11 nov. 2008.
- SELIGMANN, E.B.Jr. Potency-test requirements of the United States National Institute of Health (NIH), in: WHO, **Laboratory Techniques in Rabies**, 2nd ed. WHO, Geneva, p. 145, 1966.
- SILVA, N.N.; MARKUS, H.L.; PADILHA, A.A. Vacina anti-rábica tipo “Fuenzalida” modificada. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, p. 223-226, 1967.
- SILVA, M. V. **O uso de camundongos lactentes e a redução no período de duração da prova de inoculação no diagnóstico laboratorial da Raiva**. Tese de mestrado apresentada no Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Goés, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.
- SMITH, J.S. & SEIDEL, H.D. Rabies: a new look at an old disease. **Progress in medical virology**, v. 40: 82–106, 1993.

- SMITH, J.S.; YAGER, P.A.; BAER, G.M. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. In: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), **Laboratory Techniques in Rabies**, WHO, Geneva, p. 181-192, 1996.
- SMITH, J.S.; YAGER, P.A.; BAER, G.M. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. **Bull. World Health Organization** 48, p.535-541, 1973.
- SMITH, J.S. Rabies serology. In: Baer, G.M. (Ed.). **The Natural History of Rabies**. 2nd ed. Florida: CRC; Florida, pp. 235-252, 1991.
- STEELE, J.H. & FERNANDEZ, P.J. History of rabies and global aspects. In: **The Natural history of rabies**, editor Baer, GM, 2nd ed. Pp. 1-24, 1991.
- STERN, A.M. & MARKEL, H. The History Of Vaccines And Immunization: Familiar Patterns, New Challenges. **Health affairs**, Volume 24, Number 3. pp. 511-621, 2005.
- THE GLOBAL VACCINE INSTITUTE, 2008, Think Twice, Frequently Asked Questions. Disponível em: <<http://thinktwice.com/faq.htm#5>> . Acesso em: 04 dez. 2008.
- TRIMARCHI, C.V.; RUDD, R.D.; SAFFORD M, Jr. An in vitro virus neutralization test for rabies antibody. In: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), **Laboratory Techniques in Rabies**, WHO, Geneva, p. 193-199, 1996.
- TURNER, J. **Reckoning with the Beast: Animals, Pain, and Humanity in the Victorian Mind**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1980.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. 1913. (21 U.S.C. 151-159) The Viruses, Serums, Toxins, Antitoxins, and Analogous Products Act, **The Act of March 4**, ch. 145, sec. 1. Disponível em: <<http://www.aphis.usda.gov/vs/cvb/html/vsta.html>>. Acesso em 01 dez. 2008.
- UNITED STATES PHARMACOPOEIA – USP29 – NF24. Monographs: **Rabies Immune Globulin**; p. 1887, 2007.
- van der ARK, A.; KAPPELLE, I.S.; ÓLANDER, R.M.; ENSSLE, K.; JADHAV, S.; DONK, H.; HENDRIKSEN, C.F.M. The Pertussis Serological Potency test collaborative study to evaluate replacement of the mouse protection test. **Biologicals** 28, pp. 105-118, 2000.
- VODOPIJA, I. & CLARK, H. F. Human vaccination against rabies, in: Baer, G. M. **The Natural History of Rabies**, 2nd ed. CRC press, chp 31, p. 571-595, 620 p, 1991.

- WARKE, T.J.; KAMATH, S.; FITCH, P.S.; BROWN, V.; SHIELDS, M.D.; ENNIS, M. **The repeatability of nonbronchoscopic bronchoalveolar lavage differential cell counts.** *European Respiratory Journal*, v. 18, p. 1009–1012, 2001.
- WATERSON, A.P. & WILKINSON, L., 1978. **An introduction to the history of virology.** New York: Cambridge University Press.
- WILBUR, L.A. & AUBERT, F.A. The NIH test for potency In: **Laboratory Techniques in Rabies**, WHO, Geneva, p. 360-368, 1996.
- WEBSTER, L.T. Mouse test for measuring immunizing potency of antirabies vaccines, **Journal of Experimental Medicine**, v. 70, p. 82, 1939.
- WEBSTER, W.A. A tissue culture infection test in routine rabies diagnosis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 51, p. 367-369, 1987.
- WEBSTER, W.A. & CASEY, G.A. Virus isolation in neuroblastoma cell culture, In: WHO, **Laboratory Techniques In Rabies**, ed. Meslin et al., 4th ed., WHO, Geneva, p. 96-104, 1996.
- WEBSTER, L.T.; DAWSON, J.R. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 32, p. 570-573, 1935.
- WEISSER, K. & HECHLER, U. Rabies vaccine: potency test. In: editors. Animal welfare aspects in the quality control of immunologicals. **A Critical Evaluation of Animal Tests in Pharmacopoeial monographs.** Nottingham, FRAME; p.177-189, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002. - **Weekly Epidemiological Record**, No. 14, 77, p. 109–120, Disponível em: <http://www.who.int/wer>. Acesso em: 09 mai. 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001. **Strategies for the control and elimination of rabies in Asia.** Report of a WHO interregional consultation. Geneva, Switzerland, 17–21 July. Geneva, World Health Organization, 2002 (WHO/CDS/CSR/EPH/2002.8).
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006. Fact Sheet N°99, September, **Rabies.** Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/>. Acesso em 12 dez. 2008.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007a. Rabies surveillance standards Excerpt from "**WHO recommended standards and strategies for surveillance, prevention and control of communicable diseases**". Disponível em: <<http://www.who.int/rabies/epidemiology/Rabiessurveillance.pdf>>. Acesso em: 09 mai. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007b. **Initiate for Vaccine Research.**

Disponível em:

<http://www.who.int/vaccine_research/diseases/zoonotic/en/index5.html>

Acesso em: 09 mai. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs.

WHO Technical Report Series, no. 941. Geneva, pp. 109-110, 2007c.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **WHO Technical Report Series**, no. 658, Requirements for rabies vaccine for human use. Annex 2, Geneva. 1980.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Consultation on Rabies, First report. Geneva **WHO Technical Report Series** No. 931, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements**. Part 2: Validation. Chp. 15. Validation of analytical assays. Geneva: p. 69- 73, 1997a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, BLG 97.4. **Manual of laboratory methods for potency testing of vaccines used in the WHO expanded program on immunization**. Chp. 27. Use and validation of a single vaccine dilution assay for testing the potency of Diphtheria, Tetanus and combined vaccines, p. 162-174, 1997b.

ZOON, K.C. & GARNICK, R. Definition of a well-characterized biotechnology product. **Develops in Biological Standardization**, v. 96, p.191–197, 1998.

ZOON, K.C. Well-characterized biotechnology products: evolving to meet the needs of the 21st century. **Develops in Biological Standardization**, v. 96, p.3–8, 1998.

7. ANEXOS

7.1 ANEXO 1 – Manuscrito 1.

Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study, Journal of Virological Methods, 2008, 154, 7-13.



Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study

Wlamir Corrêa de Moura^{a,b,*}, Neuza Maria Frazatti Gallina^c, Regina Maria Mourão Fuches^c, Phyllis Catharina Romijn^d, José Paulo Gagliardi Leite^e

^a Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365 – Rio de Janeiro, CEP 21045-900, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

^c Instituto Butantan – Av. Vital Brazil, 1500 São Paulo, Brazil

^d Secretaria Estadual de Saúde, Rio de Janeiro. Rua México, 128 – 413 Rio de Janeiro, Brazil

^e Laboratório de Virologia Comparada, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Av. Brasil 4365 – Pavilhão Hélio e Peggy Pereira, Rio de Janeiro, Brazil

A B S T R A C T

Article history:

Received 28 May 2008

Received in revised form 4 September 2008

Accepted 15 September 2008

Available online 30 October 2008

Keywords:

Rabies

Virus neutralization test

RFFIT

Validation

A rabies virus neutralization potency test (VNPT), adapted to microplates from the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for rabies therapeutic immunoglobulin potency evaluation, was standardized and validated in a two-center study in Brazil. The two institutes involved in the study were: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Fundação Oswaldo Cruz) and Instituto Butantan.

Two equine rabies immunoglobulin samples, all diluted to 1 IU/ml, were tested against the WHO 2nd Rabies Human Ig International Standard. Four dilutions of the samples and standards were tested with the VNPT.

The potency of the samples was calculated in IU/ml using the probit method; linearity, accuracy, repeatability (intra-assay variation), intermediate precision (inter-assay variation) and reproducibility (inter-laboratory variation) were assessed to evaluate the reliability of the VNPT. Laboratories were arbitrarily coded as Laboratory A and Laboratory B.

The following results were obtained with the International Standard: (a) linearity, the overall coefficient of correlation of the dose–response curve was -0.97 ; (b) accuracy, % error of -0.70 (IU/ml); (c) repeatability, 17.06% (Laboratory A) and 11.61% (Laboratory B); (d) intermediate precision, 16.99% (Laboratory A) and 22.05% (Laboratory B); (e) reproducibility, 14.5%. The final conclusion was that VNPT presents satisfactory linearity, accuracy, repeatability, intermediate precision and reproducibility and is a reliable and suitable method by which to evaluate rabies immunoglobulin potency.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Rabies is a vaccine-preventable disease; however, this disease is still a significant public health problem in many Asian and African countries (WHO, 2007a), even though safe and effective vaccines exist for both human and veterinary use. Post-exposure treatment, including specific rabies immune globulin when necessary, is recommended for all cases of potential infection (WHO, 2002).

There are three classes of rabies immunoglobulins (RIG) that are available currently for passive immunization: (a) human IgGs (HRIG), (b) equine IgGs (ERIG) and (c) highly purified F(ab')₂ produced from ERIG (WHO, 2004). All three must be used according to WHO recommendations (WHO, 2007b). In Brazil, mainly the highly purified F(ab')₂ class from ERIG is used.

The measurement and standardization of the potency is the most critical of all quality control tests of RIG, first at the bulk stage and then in the final vial (Cabasso, 1991).

Virus neutralization assays are used extensively for antibody detection of rabies, and a great diversity of protocols has been described. The residual virus infectivity in these tests is determined by inoculating mice (Fitzgerald, 1996) or cell cultures (Smith et al., 1973, 1996; Trimarchi et al., 1996; Zalan et al., 1979).

* Corresponding author at: Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365 – Rio de Janeiro, CEP 21045-900, RJ, Brazil. Tel.: +55 21 38655230; fax: +55 21 22900915.

E-mail address: wlamir.moura@incqs.fiocruz.br (W.C. de Moura).

The mouse virus neutralization assay (MVNA) was the first to be developed (Atanasiu, 1996; Webster and Dawson, 1935), and due to its traditional and widespread use, it has been adopted as the standard technique against which other tests are evaluated (Smith, 1991).

Russell and Burch's concept of 3Rs (replacement, reduction and refinement) in laboratory animal testing is a recognized worthwhile goal for animal welfare (Ark et al., 2000). It can be defined as: replacement, to substitute insentient material for conscious living higher animals; reduction, to reduce the numbers of animals used to obtain information of given amount and precision; refinement, to avoid unnecessary inhumane procedures applied to laboratory animals (for review see Ref. Metz et al., 2002).

Since the precision of in vivo assays is limited (Smith, 1991), bioassays based on in vitro responses of stable cell lines are commonly used. They can provide a biologically relevant method of testing the product, and they are less variable, less expensive and less labor-intensive than in vivo assays (Robinson, 2003).

A study undertaken by the International Laboratory for Biological Standards at the Serum Institute in Copenhagen, Denmark showed that the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) is the best technique for evaluating the potency of RIG (WHO, 1998). The United States Pharmacopeia (2007) and The European Pharmacopoeia (EP) (Council of Europe, 2005b) adopted RFFIT as the official Quality Control potency test for HRIG and ERIG because it is cheaper, faster, more accurate and more reproducible than in vivo tests. RFFIT was developed originally by Smith et al. (1973), who used Lab-Tek chambers. Zalan et al. (1979) were the first to adapt the technique to 96-well microplates.

The Brazilian National Control Laboratory, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, a Fundação Oswaldo Cruz unit, is responsible for batch release tests of all the immunobiologicals used in Brazil, including HRIG and ERIG. The mouse virus neutralization assay is the technique described in the Brazilian Pharmacopoeia (Farmacopéia Brasileira, 2004). There are two national producers of highly purified F(ab')₂ from ERIG: Instituto Butantan, which is responsible for 70% of all ERIG used in the country, and Instituto Vital Brazil, which is responsible for the other 30%.

An in vitro rabies virus neutralization potency test (VNPT) that uses BHK-21 cells in 96-well plates from the RFFIT method described in the EP HRIG monograph (Council of Europe, 2005b) was standardized between the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde and the Instituto Butantan, the only laboratories that perform the in vitro test in Brazil, as an alternative to the in vivo assay for potency of therapeutic RIG. Before this standardization, each laboratory had its own protocol for RFFIT that was adapted to 96-well plates. There were slight differences between the different protocols, so the unique standardized protocol that was developed led to a better agreement of results. As a pharmacopoeial method, RFFIT does not require revalidation; but, with the adaptation to microplates it was necessary to demonstrate the method's precision and ability to achieve the suitable detection level.

Validation is the process by which the reliability and relevance of a test method are evaluated for the purpose of supporting a specific use (NIEHS, 1997; Frazier, 1990). The relevance of RFFIT has already been demonstrated and is accepted due to its very good correlation with the MVNA (Guillemin et al., 1981a, 1981b; Louie et al., 1975; Smith, 1991).

A two-center study was performed by the Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde and the Instituto Butantan. The primary goal was to establish performance specifications and validate the assay by demonstrating its reliability (variability or imprecision), linearity, accuracy, repeatability (intra-assay

Table 1

Assays performed in each Laboratory for each sample.

Sample	Laboratory A	Laboratory B	Overall no.
IS ^a			
Replicate no.	5	4	
Assay no.	6	5	
Result no.	30	20	50
BR011			
Replicate no.	5 and 2	5	
Assay no.	5	4	
Result no.	22	20	42
0505085			
Replicate no.	5 and 10	4	
Assay no.	4	4	
Result no.	25	16	41

^a International Standard.

variation), intermediate precision (inter-assay variation) and reproducibility (inter-laboratory variation).

2. Materials and methods

A study protocol was established in accordance with the WHO Good Manufacture Practice guide for analytical assay validations (WHO, 1997). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde coordinated the study, and the laboratories were arbitrarily coded as Laboratory A and Laboratory B.

2.1. Study design and assay performance specifications

- (a) Two sera were tested against the WHO 2nd HRIG International Standard (IS) obtained from the National Institute of Biological Standardization and Control (NIBSC, UK): a Brazilian Candidate National Standard ERIG (BR011) and a commercial

Table 2

Parameters evaluated to access the reliability of the VNPT according to WHO (1997) protocol.

Parameters	Assessment approach	References
Linearity	(a) Coefficient of correlation of IS dose–response curves (b) Coefficient of correlation of IS ED50 × Virus Dose (c) In all assays, as a validity criterion	(Plikaytis et al., 2000; WHO, 1997; Council of Europe, 2005a)
Accuracy	(a) % Error for IU/ml of IS	(Plikaytis et al., 2000; WHO, 1997)
Repeatability (intra-assay variation)	(a) % CV of ED50 of IS (b) % CV of estimated sample potencies: BR011 and 0505085	(Bland, 2005; Bland and Altman, 1996; Bland and Kerry, 1998; WHO, 1997)
Intermediate precision (inter-assay variation)	(a) % CV of ED50 of IS (b) % CV of estimated sample potencies: BR011 and 0505085	(Same as repeatability)
Reproducibility (inter-laboratory variation)	(a) % CV of ED50 of IS (b) % CV of estimated sample potencies: BR011 and 0505085	(Same as repeatability)

% CV, coefficient of variation percent; ED50, effective dose 50%; IS, International Standard.

Table 3

Data used for % CV calculation to assess repeatability, intermediate precision and reproducibility.

	Repeatability		Intermediate precision	Reproducibility
	Intra-assay	Overall intra-assay	Inter-assay	Inter-laboratory
S.D. ^a as SR ^b of	Variance per day, per Laboratory	Mean of variances of assays per day, per Laboratory	Overall results weighted variance per Laboratory	Overall results weighted variance (both Laboratories)
GM ^c	Laboratory results per day	Overall per Laboratory results	Overall per Laboratory results	Overall results (both Laboratories)

References: Bland (2005), Bland and Altman (1996), Bland and Kerry (1998) and WHO (1997).

^a Standard deviation.^b Square root.^c Geometric mean.

ERIG (batch number 0505085), both produced by the Instituto Butantan.

- (b) The challenge virus strain used was CVS-11 (Pasteur Institute, Paris, France), which was produced in BHK-21 cells and provided by the Instituto de Tecnologia do Paraná (Paraná, Brazil). Each laboratory used its own working virus batch.
- (c) Controls were used in every plate: negative serum, virus titration and cell culture controls.
- (d) Each laboratory tested four twofold dilutions of the three sera simultaneously on at least four different days with at least four replicates (Table 1).
- (e) The culture medium used was Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) supplemented with 5 and 2.5% fetal bovine serum for cell growth and the assay procedure, respectively.
- (f) Replicates were tested in the same plate.
- (g) Sera were diluted to 1 IU/ml. Each sample was tested in four twofold dilutions to obtain the following dilutions after mixing with the working virus dilution:
 - BR011: pre-diluted to 1:400; then, the sample was further diluted from 1:16 to 1:128 (these represent real dilutions of 1:6400 to 1:51,200)
 - ERIG 0505085: pre-diluted to 1:200 and then diluted from 1:16 to 1:128 (these represent real dilutions of 1:3200 to 1:25,600)
 - IS with 30 IU/ampoule: pre-diluted to 1:30 and then diluted from 1:16 to 1:128 (these represent real dilutions of 1:480 to 1:3840).
- (h) The CVS working dilution, containing 200 initial CCID₅₀/50 µl, was added to each well except for the two cell control wells. The final CVS concentration was 100 final CCID₅₀/50 µl after mixing with sera dilutions.
- (i) For the virus neutralization, plates were incubated between 36.5 and 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂ for 90 min. Afterwards, 50 µl of BHK-21 cells (ATCC, Rockville, USA) suspended in EMEM-2.5 (at a concentration of 7 × 10⁵ to 8 × 10⁵ cells per 50 µl) was added to each well, and the plates with

infected cells were incubated for 22 h under the same incubation conditions.

- (j) After the medium was discarded, the wells were rinsed once with PBS and then fixed in cold (−20 °C) acetone (80%, v/v) for 15 min at room temperature.
- (k) Plates were left to dry at room temperature for 10 min, stained with fluorescein-conjugated rabies antiserum (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France–cat. # 72114), incubated for 30 min at 37 °C and then rinsed twice with PBS.
- (l) The plates were read (eight fields in each well, as recommended by Zalan et al., 1979) on an inverted fluorescence microscope at 200× magnification. The results are expressed as the ratio of fluorescent fields per total fields read.

2.1.1. Statistical analyses

The raw data from Laboratories A and B were analyzed by INCQS, and the potency results (IU/ml) and/or IS ED₅₀ were calculated using a personal computer spreadsheet, developed and validated following the probit method of Council of Europe, 2005a, for each replicate in each assay of each preparation within each laboratory. The Geometric Mean (GM) and S.D. (from square root of variances) were determined in order to calculate the % CV and the root mean square % CV for the different parameters evaluated (Tables 2 and 3) (Bland, 2005; Bland and Altman, 1996; Bland and Kerry, 1998; WHO, 1997). When different numbers of replicates were used, a weighted % CV was calculated.

Linearity was evaluated using Pearson's coefficient of correlation and used as a criterion for assay validity. The % error (Plikaytis et al., 2000) was calculated to assess the accuracy.

2.2. Assay validity parameters

According to the Council of Europe, 2005b criteria, tests cannot be considered valid unless:

- With the working virus titration, 50 µl of the suspension contains between 30 and 300 CCID₅₀
- The dose–response curve has a significant slope and no significant deviations from linearity or parallelism.

3. Results

3.1. Linearity

Three approaches were used to evaluate linearity.

3.1.1. The dose–response curve of the IS % of rabies virus fluorescent fields inhibition

To obtain a normal distribution, a logarithmic base 10 transformation was performed on the mean % of rabies virus fluorescent

Table 4

Analyses of linearity using the mean % of fluorescent fields inhibited per dilution of the WHO Human Rabies Ig 2nd International Standard diluted to contain 1 IU/ml.

Dilution	% of response ^a		
	Laboratory A, n = 30	Laboratory B, n = 20	Overall n = 50
1/16	100 (2.00)	100 (2.00)	100 (2.00)
1/32	63 (1.80)	84 (1.92)	73 (1.87)
1/64	3 (0.48)	8 (0.90)	6 (0.74)
1/128 ^b	0 (no log)	0 (no log)	0 (no log)
Pearson	−1.0	−0.96	−0.97

() = log₁₀.^a Mean of the % of virus neutralization per dose.^b Not used in the calculation.

Table 5

Correlation between WHO Human Rabies Ig 2nd International Standard ED50 and rabies virus titer.

Institute	Assay no.	ED50 ^a		CCID50/50 µl	
		Reciprocal	Log10	Titer	Log10
Laboratory A	1	29.96	1.47	155.41	2.19
	2	40.76	1.61	87.33	1.94
	3	41.63	1.62	64.12	1.81
	4	32.43	1.51	169.50	2.23
	5	34.60	1.54	125.89	2.10
	6	33.40	1.52	166.81	2.22
Laboratory B	1	56.83	1.75	42.61	1.63
	2	34.60	1.54	84.19	1.93
	3	41.06	1.61	106.18	2.03
	4	42.60	1.63	87.98	1.94
Overall GM ^b		38.16	1.57	100.37	1.99

^a Effective dose 50%.^b Geometric mean.

fields inhibited by the IS per dilution (Table 4); then, this data was plotted as the measurement response (*y*-axis) against the dilution concentration (*x*-axis). The Pearson correlation was obtained for Laboratory A (−1.0) and Laboratory B (−0.96), and the overall correlation was −0.97. This data demonstrates a very good inverse correlation and shows that the method produces a satisfactory linear response.

3.1.2. The correlation between IS ED50 and rabies virus dose (expressed as the CCID50 titer)

To obtain a normal distribution, a logarithmic base 10 transformation was performed on the ED50 of the IS results (Table 5); then, the mean ED50 for the IS obtained in each assay was tested against the CCID50 titer of the CVS obtained per assay. The Pearson correlation was obtained for Laboratory A (−0.92) and Laboratory B (−0.81), and the overall correlation was −0.90, which is significant at *p* = 0.01. Fig. 1 presents the spread graphic with the trendline and

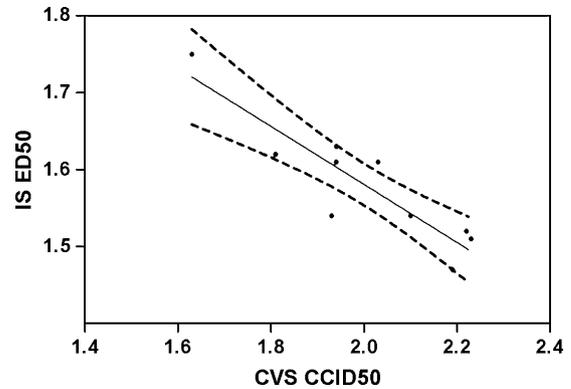


Fig. 1. Spread graphic, showing the trend line and the 95% confidence intervals, between the logarithms of the WHO Human Rabies Ig 2nd International Standard ED50 and the Challenge Virus CCID50.

95% confidence intervals. This data shows a good inverse correlation between ED50 and CCID50 titer and that the method produces a satisfactory linear response.

3.1.3. An assay validity parameter

A routine to evaluate deviations from linearity was included in the probit spreadsheet, as described in the EP (Council of Europe, 2005a), that was used as a parameter for assay validity; our data showed no deviation from linearity in any of the tests performed in the study.

3.2. Accuracy

Since there are no pure standards in biological samples, often the accuracy cannot truly be assessed with a direct comparison to a known standard. As such, we took a practical approach to evaluate the accuracy of our results.

Table 6

Individual assay and pooled geometric means of potency values expressed in IU/ml per sample (against WHO Human Rabies Ig 2nd International Standard) with 95% confidence interval.

Sample	Laboratory A			Laboratory B		Overall GM
	Assay	GM ^a	Range	GM	Range	
IS ^b	1	30.37	(27.86–36.79)	30.10	(26.97–33.79)	–
	2	30.27	(26.08–38.23)	30.20	(24.79–34.75)	–
	3	30.44	(23.43–37.43)	30.04	(29.28–33.06)	–
	4	30.19	(25.73–33.98)	30.30	(26.59–38.21)	–
	5	30.30	(27.02–39.23)	^c	–	–
	6	30.05	(26.78–30.86)	^c	–	–
GM ^a		30.27	(28.52–31.56) ^d	30.16	(28.57–31.50) ^d	30.21 (28.97–31.07) ^d
BR011	1	481.54	(364.05–628.96)	716.23	(640.45–805.77)	–
	2	310.85	(253.58–364.17)	699.40	(620.15–883.98)	–
	3	488.94	(448.12–557.66)	609.16	(448.56–726.46)	–
	4	570.58	(553.69–587.97)	704.62	(636.37–741.76)	–
	5	604.84	(487.93–650.40)	^c	–	–
GM		487.88	(414.15–528.59) ^d	680.95	(638.01–726.78) ^d	559.43 (511.19–612.22) ^d
0505085	1	259.66	(228.16–293.40)	382.22	(227.66–320.52)	–
	2	173.64	(168.02–202.77)	308.05	(264.31–390.88)	–
	3	325.78	(266.75–342.48)	321.39	(277.06–392.08)	–
	4	182.54	(142.11–237.53)	379.39	(351.62–426.49)	–
GM		217.74	(193.57–244.92) ^d	320.95	(292.14–352.59) ^d	253.34 (229.60–279.52) ^d

^a Geometric mean.^b International Standard.^c Not done.^d 95% Confidence interval.

Table 7

Individual assays and pooled geometric means of ED50 values expressed as a reciprocal of dilution for WHO Human Rabies Ig 2nd International Standard diluted to 1 IU/ml, with 95% confidence interval.

Sample	Assay	Laboratory A		Laboratory B		Overall GM
		GM	Range	GM	Range	
IS ^a	1	29.16	(23.06–36.74)	56.83	(51.09–64.00)	–
	2	40.76	(35.44–51.94)	34.60	(28.59–40.08)	–
	3	41.63	(32.00–51.94)	41.06	(40.08–45.25)	–
	4	32.43	(27.82–36.74)	42.60	(37.75–54.26)	–
	5	34.60	(31.17–45.25)	^b	–	–
	6	33.40	(29.81–34.36)	^b	–	–
GM ^c		35.21	(32.89–37.69) ^d	43.07	(39.03–47.52) ^c	38.16 (35.89–40.58) ^c

^a International Standard.

^b Not done.

^c Geometric mean.

^d 95% Confidence interval.

3.2.1. Percent error of IS IU/ml

Since there were no significant differences between the ED50 results of Laboratories A and B, the potency in IU/ml (Table 6) was obtained for each IS replicate (against the ED50 mean per test).

The IS individual and overall % error of Laboratories A and B were determined as described by Plikaytis et al. (2000), which measures the degree of error between a laboratory's result and the assigned value.

When the IS IU/ml geometric means were tested with the Student's *t*-test ($t=2.3$ $P=0.09$), no significant differences were found (0.06 log₁₀) between Laboratories A ($n=6$) 30.27 IU/ml and B ($n=4$) 30.16 IU/ml; the overall GM was 30.21 IU/ml.

The % error calculated for IU/ml values were similar between the two laboratories, with -0.90% for Laboratory A and -0.53% for Laboratory B. An overall % error of -0.70% was achieved.

3.3. Assay variation

The repeatability, intermediate precision and reproducibility of the VNPT were determined as described in Section 2.1.1. The potency and ED50 results for Laboratories A and B are shown in Tables 6 and 7. In Table 8, a summary of the assay variation analysis is shown.

3.3.1. Repeatability

In Laboratories A and B, repeatability was determined by the variation in the IS ED50 and in the potency results of the ERIGs BR011 and 0505085 (IU/ml).

Table 8

Assay variation-% CVs found in the study for evaluating repeatability, intermediate precision and reproducibility of VNPT.

Sample	% CV ^a		
	IS ^b (ED50 ^c)	BR011 (UI/ml)	050585 (UI/ml)
Laboratory A			
Repeatability	17.06	11.00	11.37
(Range)	(6.09–18.89)	(4.25–20.25)	(8.83–13.39)
IP ^d	16.99	19.77	12.35
Laboratory B			
Repeatability	11.61	12.78	15.18
(Range)	(5.63–16.41)	(7.21–18.11)	(9.59–19.73)
IP	22.05	13.20	17.67
Reproducibility	15.83	13.73	13.97

^a Coefficient of variation.

^b International Standard.

^c Effective dose 50%.

^d Intermediate precision.

3.3.1.1. Determined by the variation in the IS ED50 results. In Laboratory A, the intra-assay % CV for IS ED50 ($n=30$) ranged from 6.09 to 18.89% (Table 6); the overall % CV was 17.06%. In Laboratory B ($n=20$), it ranged from 5.63 to 16.41% (Table 8), and the overall % CV was 11.61%.

3.3.1.2. Determined by the variation in the potency results (IU/ml) of ERIGs BR011 and 0505085. In Laboratory A, for ERIG BR011, the intra-assay % CV ($n=22$) ranged from 4.25 to 20.25% (Table 8), and the overall intra-assay % CV was 11.00%. In Laboratory B ($n=20$), it ranged from 7.12 to 18.11% (Table 8), and the overall intra-assay % CV of the replicates was 12.78%.

In Laboratory A, for ERIG 0505085, the intra-assay % CV ($n=25$) ranged from 8.83% to 13.39% (Table 8), and the overall intra-assay % CV was 11.37%. In Laboratory B ($n=16$), it ranged from 9.59 to 19.73% (Table 8), and the overall intra-assay % CV was 15.18%.

3.3.2. Intermediate precision

3.3.2.1. Determined by the variation in IS ED50. In Laboratory A ($n=6$), the inter-assay % CV in the IS ED50 was 16.99%, and in Laboratory B ($n=5$), it was 22.05% (Table 8).

3.3.2.2. Determined by the variation in the potency results (IU/ml) of ERIGs BR011 and 0505085. In Laboratory A ($n=5$), for BR011, the inter-assay % CV was 19.77%, and in Laboratory B ($n=4$), it was 13.20% (Table 8). In Laboratory A ($n=4$), for ERIG 0505085, the inter-assay % CV was 12.35%, and in Laboratory B ($n=4$), it was 17.67% (Table 8).

3.4. Reproducibility

3.4.1. Determined by the variation in the IS ED50

The weighted inter-laboratory % CV was 15.51% when calculated using the data obtained with the IS ED50 in the two laboratories ($n=50$).

3.4.2. Determined by the variation in the potency results for ERIG 0505085 and BR011

The weighted % CV calculated with all the potency results in IU/ml obtained in the two laboratories with BR011 ($n=42$) was 12.85% and with 0505085 ($n=41$) was 16.26%.

4. Discussion

Quality Assurance Systems, such as GMP and ISO/IEC, require the use of appropriately validated analytical procedures. While pharmacopoeial methods do not require revalidation, for batch release

of medical products, certain procedures should be conducted to ensure that methods are applicable at the time of use. It may also be necessary to confirm the precision of the method or the ability to achieve the detection levels of the validated method (Australian Government, 2006). Validation of a test method is the process by which the reliability, an objective measure of a method's intra- and inter-laboratory reproducibility (Balls et al., 1990), and relevance are evaluated for the purpose of supporting a specific use (NIEHS, 1997; Frazier, 1990). A test method is considered validated when its performance characteristics, advantages and limitations have been adequately determined for a specific purpose (Balls et al., 1990). There is no optimal or minimum level of reproducibility or association with the event of interest that must be reached for a successful validation. The levels of reliability and relevance that are needed will depend on the conditions under which the test will be used and the purposes to which its results will be applied (Robinson, 2003). To assess the reliability of a binding type test, such as EIA, Ark et al. (2000), and Jacobson (1998), adopted a variation of 20% or less as good CV % for repeatability. For WHO (1997), binding assays typically have a 5 to 20% variability, while cell and whole animal assays may have a variability above 50%. The present manuscript compares the results obtained in a two-center study performed by two Brazilian Laboratories (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde and Instituto Butantan) for the validation of an alternative RIG in vitro test for potency evaluation. It demonstrated that the VNPT presents a satisfactory variation according to the standards adopted by WHO (1997), Jacobson (1998) and Ark et al. (2000). To verify the reliability of the VNPT, the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde revised the ED50 control charts of the ERIG National Standard that are currently in use and found a % CV of 78% ($n = 34$) in MVNA and 15.05% ($n = 20$) in VNPT (unpublished data). Also, the overall GM obtained in this study for the IS ED50 reciprocal of dilution agrees well with those obtained by Fitzgerald and Rastogi (1985) and Cliquet et al. (1998), who used the same IS.

5. Conclusion

The virus neutralization potency test for rabies in BHK-21 cells presents satisfactory linearity, accuracy, repeatability, intermediate precision and reproducibility; it is a reliable, rapid and convenient method to evaluate the potency of ERIG and HRIG.

Acknowledgements

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; Dr. Hisako Gondo Higashi, Director of the Division of Technological Developing and Production, from Instituto Butantan for the production and supply of the ERIG Candidate Standard; Dr. Angela Aparecida Preto, from the Instituto de Tecnologia do Paraná, for providing the virus sample; Dr. Eleonora Meira de Vasconcelos for English revision; Coordination of Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; Instituto Oswaldo Cruz (IOC) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

References

Ark, A., Kappelle, I.S., Ólander, R.M., Enssle, K., Jadhav, S., Donk, H., Hendriksen, C.F.M., 2000. The Pertussis Serological Potency test collaborative study to evaluate replacement of the mouse protection test. *Biologicals* 28, 105–118.

Atanasiu, P., 1996. Quantitative assay and potency test of rabies serum and immunoglobulin. In: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*. WHO, Geneva, pp. 314–318.

Australian Government, March, 2006. Therapeutic Goods Administration, Finished Product (Medicine) Analytical Procedure Validation for Complementary Medicines, Available at: <http://www.tga.gov.au/cm/finishval.pdf>.

Balls, M., Botham, P., Cordier, A., Fumero, S., Kayser, D., Koëter, H., Koundakjian, P., Lindquist, N.G., Meyer, O., Pioda, L., Reinhardt, C., Rozemond, H., Smyrniotis, T., Spielmann, H., Van Looy, H., van der Venne, M.-T., Walum, E., 1990. Report and recommendations of an international workshop on promotion of the regulatory acceptance of validated non-animal toxicity test procedures. *ATLA* 18, 339–344.

Bland, M.J., 2005. How should I calculate a within-subject coefficient of variation? Available at: <http://www-users.york.ac.uk/~mb55/meas/cv.htm>.

Bland, M.J., Altman, D.G., 1996. Statistics notes: measurement error proportional to the mean. *BMJ* 313 (July), 106.

Bland, M.J., Kerry, S.M., 1998. Statistics notes: weighted comparison of means. *BMJ* 316, 129.

Cabasso, V.J., 1991. Local wound treatment and passive immunization. In: Baer, G.M. (Ed.), *The Natural History of Rabies*, 2nd ed. CRC, Florida, pp. 551–570.

Cliquet, F., Aubert, M., Saugné, L., 1998. Development of a fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J. Immunol. Methods* 212, 79–87.

Council of Europe, 2005a. Assays depending upon quantal responses. (Chapter - General texts - 4). In: *The European Pharmacopoeia*, 5th ed. Strasbourg, France, pp. 484–486.

Council of Europe, 2005b. Human rabies immunoglobulin (Monograph No. 0723). In: *The European Pharmacopoeia*, 5th ed. Strasbourg, France, pp. 1750–1751.

Farmacopéia Brasileira, 2004. Fascículo 5-4a Ed. parte II. Soro Anti-rábico. monografia 109. Atheneu Ed. São Paulo, SP, Brasil.

Fitzgerald, E.A., Rastogi, S.C., 1985. A collaborative study to establish an International Standard Rabies immunoglobulin of human origin. *J. Biol. Stand.* 13, 327–333.

Fitzgerald, E.A., 1996. Potency test for anti-rabies serum and immunoglobulin. In: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*. WHO, Geneva, pp. 417–422.

Frazier, J.M., 1990. Scientific criteria for validation of in vitro toxicity tests. *OECD Environment Monograph Number 36*. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) 36, pp. 1–62.

Guillemin, F., Tixier, G., Soulebot, J.P., Chappuis, G., 1981a. Comparison de deux méthodes de titrage des anticorps antirabiques neutralizants. *J. Biol. Stand.* 9, 147–156.

Guillemin, F., Tixier, G., Soulebot, J.P., Chappuis, G., 1981b. Résultats comparés des anticorps antirabiques per deux méthodes utilisant l'immunofluorescence. *J. Biol. Stand.* 9, 157–160.

Jacobson, R.H., 1998. Validation of serological assay for diagnosis of infectious diseases. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 17 (2), 469–486.

Louie, R.E., Dobkin, M.B., Meyer, P., Chin, B., Roby, R.E., Hammar, A.H., Cabasso, V.J., 1975. Measurement of rabies antibody: comparison of the mouse neutralization test with the rapid fluorescent focus inhibition test. *J. Biol. Stand.* 3, 365–368.

Metz, B., Hendriksen, C.F.M., Jiskoot, W., Kersten, G.F.A., 2002. Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. *Vaccine* 20, 2411–2430.

NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences), 1997. Validation and regulatory acceptance of toxicological test methods: a report of the ad hoc Inter-agency Coordinating Committee on the validation of alternative methods, NIH Publication No. 97-3981, NIEHS, Research Triangle Park, North Carolina, U.S.A., Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/about_docs/validate.pdf.

Plikaytis, B.D., Goldblatt, D., Frasch, E., Blondeau, C., Bybel, M.J., Gienbink, G.S., Jonsdottir, I., Käyhty, H., Konradsen, H.B., Madore, D.V., Nahm, M.H., Schulman, C.A., Holder, P.F., Lezhava, T., Elie, C.M., Carlone, G.M., 2000. An analytical model applied to a multicenter pneumococcal enzyme-linked immunosorbent assay study. *J. Clin. Microbiol.* 38 (6), 2043–2050.

Robinson, J., 2003. Bioassays—a continuously developing field. *Drug Discov. Today* 8 (15), 676–678.

Smith, J.S., Yager, P.A., Baer, G.M., 1996. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. In: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*. WHO, Geneva, pp. 181–192.

Smith, J.S., Yager, P.A., Baer, G.M., 1973. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull. World Health Organ.* 48, 535–541.

Smith, J.S., 1991. Rabies serology. In: Baer, G.M. (Ed.), *The Natural History of Rabies*, 2nd ed. CRC, Florida, pp. 235–252.

Trimarchi, C.V., Rudd, R.D., Safford Jr., M., 1996. An in vitro virus neutralization test for rabies antibody. In: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*. WHO, Geneva, pp. 193–199.

United States Pharmacopoeia-USP29, 2007, NF24. Monographs: Rabies Immune Globulin; p. 1887.

Webster, L.T., Dawson, J.R., 1935. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 32, 570–573.

World Health Organization, 1998. Expert Committee on Biological Standardization. 39th report. Geneva WHO Technical Report Series No. 785.

World Health Organization, 2004. Expert Consultation on Rabies, First report. Geneva WHO Technical Report Series No. 931.

World Health Organization, 2007a. Human and animal rabies; Rabies: A neglected zoonotic disease. Available at: <http://www.who.int/rabies/en/>.

World Health Organization, 2007b. Rabies Surveillance Standards Excerpt from "WHO recommended standards and strategies for surveillance, prevention and control of communicable diseases". Available at: <http://www.who.int/rabies/epidemiology/Rabiessurveillance.pdf>.

World Health Organization, 2002. *Weekly Epidemiological Record*, No. 14 (77), pp. 109–120, Available at: <http://www.who.int/wer>.

World Health Organization, 1997. WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. Chp. 15, Validation of analytical assays. WHO, Geneva, pp. 65–73.

Zalan, E., Wilson, C., Pukitis, D., 1979. A microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. *J. Biol. Stand.* 7, 213–220.

7.2 ANEXO 2 – Manuscrito 2.

Potency evaluation of rabies vaccine for human use: the impact of the reduction in the number of animals per dilution, Journal of Virological Methods, 2009, in press.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

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



Potency evaluation of rabies vaccine for human use: The impact of the reduction in the number of animals per dilution

Wlamir Corrêa de Moura^{a,b,*}, Humberto Pinheiro de Araujo^a, Pedro Hernan Cabello^c, Phyllis Catharina Romijn^d, José Paulo Gagliardi Leite^e

^a Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, Brazil

^c Departamento de Genética, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, Brazil

^d Secretaria Estadual de Saúde, Rio de Janeiro, Rua México, 128–413, Rio de Janeiro, Brazil

^e Laboratório de Virologia Comparada, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Pavilhão Hélio e Peggy Pereira, Rio de Janeiro, Brazil

ABSTRACT

Article history:

Received 7 November 2008

Received in revised form 19 January 2009

Accepted 21 January 2009

Available online xxx

Keywords:

Rabies vaccine

NIH test

Potency testing

3Rs

In order to evaluate the effects of reducing the number of animals used in the NIH mouse protection test for potency determination of inactivated rabies vaccines for human use, a retrospective study of the results obtained in the Brazilian National Control Laboratory, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), was performed, comprising 214 vaccine lots. The INCQS Standard Operating Procedure establishes the use of three vaccine dilutions and 18 animals per dilution, separated into two cages with 9 mice each. The results of the two cages of each dilution were considered as two different groups (C1 and C2), and therefore, for each vaccine lot, three results were obtained: one for the standard test (ST) with 18 mice, one using the C1 cages with 9 mice and another using the C2 cages with 9 mice. The results were evaluated as repeated measures of the same method on the same samples. In this study, the effects of the reduction in: (a) the measurement error and its association with the size of measurement, (b) the agreement between the results using the concordance coefficient of correlation, (c) the agreement of categorized results as “Pass” or “Fail” using the Kappa index, (d) the precision of potency determinations using the 95% confidence interval and (e) the incidence of statistically invalid assays due to non-linearity and non-parallelism were evaluated. It was concluded that the results from the NIH mouse protection test using 9 mice per dilution are in good agreement with the results obtained using 18 mice per dilution. Therefore, nine animals per dilution is a suitable number to meet the statistical requirement for valid assays.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The intrinsic variability inherent in manufacturing biologicals requires the testing of all batches and serials (McVey et al., 2003). Traditionally, laboratory animals have played a major role in the quality control of vaccine batches. Consequently, the use of animals for this purpose is extensive, and there is a relatively high frequency of tests with substantial pain and suffering (Hendriksen et al., 1998). This is particularly true in potency tests, which can be multi-dose models that include a challenge procedure with virulent microorganisms in order to demonstrate the protective ability of the vaccine. Metz et al. (2002) reported that approximately 1.5 million animals per year were being used in Europe for routine quality control of vaccines, but no precise figures on animal use

are available, it is generally assumed that the number exceeds 15% of the total animals used in biomedical research (Hendriksen, 2007).

Theoretically, potency tests that depend on the in vivo immune response of laboratory animals would be more likely to detect low potency batches where the reduction in potency is the result of formulation problems (McVey et al., 2003). However, the predictive capacity of these tests for the vaccination of humans is questionable.

Quality control should be seen as an instrument for monitoring consistency in the production and testing of vaccines (Griffiths, 1996).

Russell and Burch's concept of the 3Rs (replacement, reduction and refinement) is a recognized worthwhile goal for animal welfare (van der Ark et al., 2000). It can be defined as: replacement, to substitute insentient material for conscious living higher animals; reduction, to reduce the numbers of animals used to obtain information, and refinement, to avoid unnecessary inhumane procedures applied to laboratory animals (for review, see Metz et al., 2002).

* Corresponding author at: Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, CEP 21045-900, Brazil. Tel.: +55 21 3865 5230; fax: +55 21 2290 0915.

E-mail address: wlamir.moura@incqs.fiocruz.br (W.C.d. Moura).

The evaluation of the potency of inactivated rabies vaccines has long been the subject of research. However, it has been difficult to identify a single method by which all of the necessary parameters of the different types of inactivated rabies vaccines can be satisfactorily measured (Barth et al., 1988). The National Institutes of Health (NIH) mouse protection test for the determination of potency was originally developed at the United States NIH (Bethesda, MD, USA). Briefly, the test measures the degree of protection conferred by inactivated rabies vaccines in immunized mice challenged intracerebrally with rabies virus (Wilbur and Aubert, 1996). The variability of this *in vivo* test is well known and can be measured using a reference vaccine in each test performed (Fitzgerald et al., 1978).

The NIH potency test was adopted by the World Health Organization (WHO) Expert Committee on Rabies and is now part of many national and international requirements for the evaluation of inactivated rabies vaccines. The test has been used without any significant improvements or alterations since its inclusion in the USA requirements in 1953 (Barth et al., 1988).

In 1992, the WHO recommended that the potency tests for inactivated rabies vaccines in animals should be replaced by an antigen quantification procedure. However, as a consensus was not achieved (Bruckner et al., 2003), the potency assay approved by the WHO “Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs” remains the NIH potency test. The NIH potency test was recognized as a reliable assay (WHO, 2007) despite the large number of animals and the pain and suffering inflicted upon them (Bruckner et al., 2003).

Currently, groups containing an equal number of animals are used for the test and reference vaccines. When veterinary vaccines are being evaluated, each group contains 10 mice with a single immunization (Council of Europe, 2008a; OIE, 2004), while vaccines for human use require between 16 (Wilbur and Aubert, 1996) and 18 (Farmacopéia Brasileira, 2004) animals in each group, with two immunizations 7 days apart.

A simplified test using a single dilution of the vaccine has been suggested by the WHO (2007) and the European Pharmacopoeia (*Ph. Eur.*), but such a test only determines if the vaccine has a potency significantly higher than the required minimum. The simplified test does not generate information on the validity of each individual potency determination, such as the slope, linearity and parallelism, because there is no dose–response curve (Council of Europe, 2008a).

Applying the 3Rs concept to bacterial vaccines, Hendriksen et al. (1987) published a study evaluating the effects of the reduction in the number of animals for the potency test of adsorbed diphtheria and tetanus vaccines, using a practical approach for retrospective data analysis. Based on the results of this study, and similar studies, the *Ph. Eur.* and the WHO now specify that only enough animals should be used to achieve a confidence interval within the specified range for these bacterial vaccines (Hendriksen, 2004).

Bruckner et al. (1988) performed a study on rabies vaccines for human and veterinary use and recommended that at least four dose groups of 10 mice should be used for testing. They also stated that it would not be possible to reduce the number of mice used in the NIH test to less than 10 because such a reduction would lead to results that would be much less precise.

Weisser and Hechler (1997) stated that the difference between the test procedures for human use and veterinary vaccines were incomprehensible and lacked any scientific basis. These authors suggested, by analogy with the requirements for the potency testing of bacterial vaccines, that the number of animals in the NIH test for human use vaccines (at that time at least 16 per dilution) should be left open and that there was evidence that this number

could be reduced to 10 animals per group, as already stipulated by the monograph for the evaluation of rabies vaccines for veterinary use.

As a consequence, the monograph for rabies vaccines for human use by the *Ph. Eur.* no longer specifies the number of animals but suggests that a suitable number of animals should be used to meet the statistical requirement for a valid test.

In Brazil, prior to batch release, the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), the National Control Laboratory of the Ministry of Health, has been performing the NIH test since 1987, according to the Brazilian Pharmacopoeia (*Ph. Bras.*) monograph for rabies vaccine for human use, using 18 animals per dilution (Farmacopéia Brasileira, 2004).

The aim of this manuscript is to retrospectively evaluate the effect of reducing the number of mice used per dilution, from 18 to 9, for the routine NIH test to evaluate the potency of rabies vaccines for human use.

2. Animals, material and methods

2.1. Animals

Male and female Swiss mice (weighing 11–15 g) from the Fundação Oswaldo Cruz breeding stock were used. The mice were housed in standard plastic cages with stainless-steel covers and wood shavings as bedding and kept under controlled temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$, approximately 70% relative humidity and a 12:12 h photoperiod with lights on at 08:00). A standard commercial diet for laboratory rats and mice (CR1 Nuvital, Nuvilab Ltd., Curitiba, PR, Brazil) and tap water were provided *ad libitum*. The experimental protocols were performed in accordance with the EC Directive 86/609/EEC for animal experiments and were approved by the “Ethics Committee on the Use of Laboratory Animals of Fundação Oswaldo Cruz” (CEUA – FIOCRUZ).

2.2. NIH test

The NIH test was conducted by immunizing at least two sets of at least three groups of mice twice intraperitoneally 7 days apart. The mice were immunized with 0.5 ml of at least three dilutions of the reference vaccine or the test vaccines. Seven days after the last vaccination, the immunized animals and the control non-immunized group were challenged intracerebrally with 0.03 ml of the Challenge Virus Standard (CVS) mouse-brain strain of fixed rabies virus (Wilbur and Aubert, 1996). The mice were observed for 14 days, and the relative potency, expressed in IU/dose of the test vaccine, was calculated using the probit analysis.

At the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, the NIH test is performed following the *Ph. Bras.* (Farmacopéia Brasileira, 2004), using three dilutions. For each dilution, 18 animals are randomly distributed between two cages (nine animals each), and the results are registered separately for each cage. Therefore, for each lot, six cages with nine animals each are used.

In order for the test to be considered valid, specific criteria had to be achieved: a significant slope, no significant deviations from linearity or parallelism in the dose–response curve, the challenge virus titer (at least 10 times the mouse intracerebral 50% lethal dose) and confidence limits of the estimated potency ($p=0.95$). In order to pass the test, the lot must retain a minimum potency value, depending upon the vaccine type.

The retest criteria adopted at the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde for the potency test of a rabies vaccine for human use are that a single failed test is not considered conclusive and that the vaccine is always retested at least once. If the weighted geometric mean (Council of Europe, 2008c) of these two results passes the test, it is conclusive. If that mean does not pass, another

retest is performed, and the weighted geometric mean of the three results is considered as the final potency result.

In the present study, only the valid tests were considered.

2.3. Retrospective study

This test procedure allowed us to consider the set formed by the first cages of each dilution as being one group (C1) and the set formed by the second cages of each dilution (C2) as one replicate of the first group.

The potency values were reviewed and analyzed using the probit analysis as described in the *Ph. Eur.* (Council of Europe, 2008c). For each assay, three results, expressed in IU/dose, were obtained for the relative potency: (1) the standard test (ST) using the score based on the number of survivors/deaths in all 18 animals per dilution, (2) the potency using only the score results of the first cage (C1) and (3) the potency using the score results of the second cages (C2) of each dilution. In order to avoid an additional loss of precision, the reference vaccine was always used for the calculations with 18 animals per dilution.

2.4. Vaccines

A total of 214 human use vaccine lots, of which 166 (77.57%) were from Suckling Mouse Brain vaccine (SMBV) and 48 (22.43%) were from tissue culture (46 (21.5%) were Purified Vero Cell vaccines, 1 (0.47%) was a Purified Duck Embryo Cell vaccine, and 1 (0.47%) was a Human Diploid Cell vaccine), were tested in 38 independent assays using 14,748 mice (11,556 for the vaccine lots and 3192 for the reference vaccine and challenge virus control). Three different lots of reference vaccines were used, the Brazilian national reference vaccine lot BR006 was used in 33 out of the 38 assay runs. The other five assays used another national reference vaccine or the WHO 5th International Reference.

2.5. Data analysis

The results obtained with the C1 and C2 groups are related to those of the ST group, but this is irrelevant for the evaluation of the effects of the reduction in the number of animals (Hendriksen et al. 1987). However, this did not permit the use of the most straightforward statistical methods for comparing the two groups.

Therefore, in order to demonstrate the reliability of the results obtained with the C1 and C2 groups, they were compared to the results obtained with the ST group (ST versus C1 and ST versus C2) as repeated measures of the same method.

As an exploratory data analysis, the fit of the potency results to the normal distribution was evaluated by histograms and the Kolmogorov–Smirnov test. The Student's *t* test for paired data was used to evaluate if there were statistically significant differences between the potency results of the three groups.

Since the fit to the normal distribution has been demonstrated and no significant differences between the results from the different group were detected, the other effects of the reduction were evaluated by determining the following parameters:

2.5.1. Effects of the reduction on the measurement error between the groups

Repeated measurements on the same subject will vary around the true value because of measurement error (Bland and Altman, 1996). The measurement error in logarithmic transformed data was evaluated using the within-sample coefficient of variation (Bland, 2005) between the ST and C1 groups, the ST and C2 groups and the C1 and C2 groups. This was also evaluated using the association of measurement error with the size of the measurement using the

Bland–Altman plot (Bland and Altman, 1986) and interpreted following the identity approach, as described by Petersen et al. (1997). These methods were used to demonstrate that the results of the groups did not deviate from each other by more than the inherent imprecision of the method by showing the normal distribution fit, evaluated with the chi-square test.

2.5.2. Concordance correlation coefficient (CCC)

Lin's CCC (Lin, 1989, 1992) was used on the logarithmic transformed data to examine the reproducibility of the continuous measurements using a single method by measuring the agreement to the identity line. It combines a coefficient of precision (Pearson coefficient of correlation), which measures how closely the observations fall on the fitted line, and a coefficient of accuracy, which measures how closely the fitted line agrees with the identity line. The coefficient of precision (squared) and the coefficient of accuracy are on a scale of 0% (no agreement) to 100% (perfect agreement) and can be used to identify when corrective action is needed. The CCC is the product of the coefficient of precision and the coefficient of accuracy (Lin, 2000).

The strength of the agreement expressed by the CCC between the ST and C1 groups and the ST and C2 groups was classified as Unsatisfactory (<0.6), Satisfactory (0.61–0.9) or Excellent (0.91–1.0), as described by Warke et al. (2001).

2.5.3. Cohen's Kappa index to evaluate the agreement of the results

The agreement between the ST and C1 groups and the ST and C2 groups was assessed using the Cohen's Kappa index. This is a measure of association (correlation or reliability) between two measurements in the same individual when the measurements are categorical. This index is often used as an inter-rater agreement evaluation tool. The potency results of the 214 lots were categorized as "Pass" or "Fail to Pass". The minimum requirements (Farmacopéia Brasileira, 2004) depended upon the type of vaccine (1.0 IU/dose for the SMBVs and 2.5 IU/dose for the cell culture vaccines). In order to check the agreement, vaccine lots that were categorized as "Fail to Pass" (23 lots, 10.75%) were included in the study. Contingency tables were then generated, and the Cohen's Kappa index was calculated and classified as Poor (<0.00), Slight (0.00–0.20), Fair (0.21–0.40), Moderate (0.41–0.60), Substantial (0.61–0.80) or Almost Perfect (0.81–1.00), as described by Landis and Koch (1977). The Kappa indices were also analyzed using the Bayesian approach, as described by McBride (2005), which demands a lower 95% one-sided confidence limit for Kappa indices greater than 0.60 to assure a "Substantial Agreement".

2.5.4. Effects on the 95% confidence limits

The effects of the reduction in the number of mice on the 95% confidence limits were assessed diagrammatically. This approach was applied to 51 lots (of 214 lots, 23.8%) that were randomly selected using randomly generated numbers. The lower and upper limits of the 95% confidence interval were expressed as a percentage of the potency values, as described by Hendriksen et al. (1987). Invalid assays were excluded from the calculations. The increase of the width for the confidence interval was evaluated comparing the limits of the mean of the three groups.

Furthermore, the criteria described by Weisser and Hechler (1997), i.e., adopting a lower confidence limit value instead of limiting the width of the confidence interval to 25–400%, were applied on the assays deemed invalid due to lower and/or upper limits that were outside of the specifications.

The effects of the reduction in the number of mice on the 95% confidence limits of the ED50 of the reference vaccine were also evaluated.

Table 1
Exploratory data analysis.

Data	n	Mean ^a	Log ^b	95% CI ^c	SD ^d	K-S p ^e	Conclusion
ST	214	2.034	0.3084	0.2697–0.3469	0.2861	0.268	Accept normality
C1	214	2.091	0.3205	0.2792–0.3622	0.3082	0.379	Accept normality
C2	214	2.010	0.3034	0.2624–0.3445	0.3047	0.081	Accept normality

^a Mean of potency in IU/dose.^b Mean of logarithm of potency in IU/dose.^c 95% confidence interval for mean of logarithm of potency in IU/dose.^d Standard deviation of logarithm of potency.^e p Value for Kolmogorov–Smirnov test.

2.5.5. Effects on linearity and parallelism

In the present study, only valid tests that did not presented deviations from linearity and parallelism were considered. The incidence of statistically invalid assays in the C1 or C2 groups due to non-linearity and non-parallelism as a consequence of the reduction in the number of mice was evaluated. This approach was applied to 51 of 214 lots (23.8%) that were randomly selected using randomly generated numbers.

3. Results

3.1. Exploratory data analysis

The logarithmic transformed data sets from the ST, C1 and C2 groups were analyzed using the Kolmogorov–Smirnov test in order to determine if they fit into a normal distribution. Outliers were not removed from the calculations. The mean and standard deviations are presented in Table 1, and all three data sets were normally distributed.

3.1.1. Comparison of the potency results

The results of the three groups were examined using the Student's *t* test for paired data in order to determine if there were statistically significant differences between their means. No significant difference was found (Table 2).

3.2. Effects of the reduction of the number of tested animals on the measurement error between groups

3.2.1. Within-sample coefficient of variation

In order to evaluate the measurement error, the within-sample coefficient of variation (% CV) between the ST and C1 groups, the ST and C2 groups and the C1 and C2 groups was calculated.

The % CV was 25.29% between the ST and C1 groups and 23.32% between the ST and C2 groups. The intra-assay reproducibility of results using nine animals per dilution was 39.37% (between the C1 and C2 groups).

3.2.2. Bland–Altman plot

The plot of the difference of the ST and C1 (or C2) groups versus the average of the ST and C1 (or C2) groups demonstrated that the differences did not vary in any systematic way over the range of measurements in any of the groups (Fig. 1).

Table 2
Application of the Student's *t* test for paired data.

Pairs	<i>t</i>	<i>p</i> ^a	d.f.	
Log ST × Log C1	−1.579	0.116	213	ns
Log ST × Log 2	0.652	0.515	213	ns
Log C1 × Log C2	1.296	0.196	213	ns

d.f. = degrees of freedom. ns = not significant.

^a p Value for *t* test.

The bias (log 10) was −0.0121 (SD log 10 = 0.1122), and the 95% limits of agreement (log 10) were −0.23 to 0.21 for ST minus C1 (Fig. 1A). Similarly, the bias (log 10) was 0.0050 (SD log 10 = 0.1122), and the 95% limits of agreement (log 10) were −0.22 to 0.23 for ST minus C2 (Fig. 1B).

3.2.2.1. Identity approach. The Bland–Altman plots were also evaluated using the identity approach with the chi-square test used to evaluate the normal distribution fit of the differences between the ST and C1 groups (d.f. = 12; chi-square = 17.964; *p* = 0.117) and between the ST and C2 groups (d.f. = 11; chi-square = 17.184; *p* = 0.103). Both comparisons accepted normality.

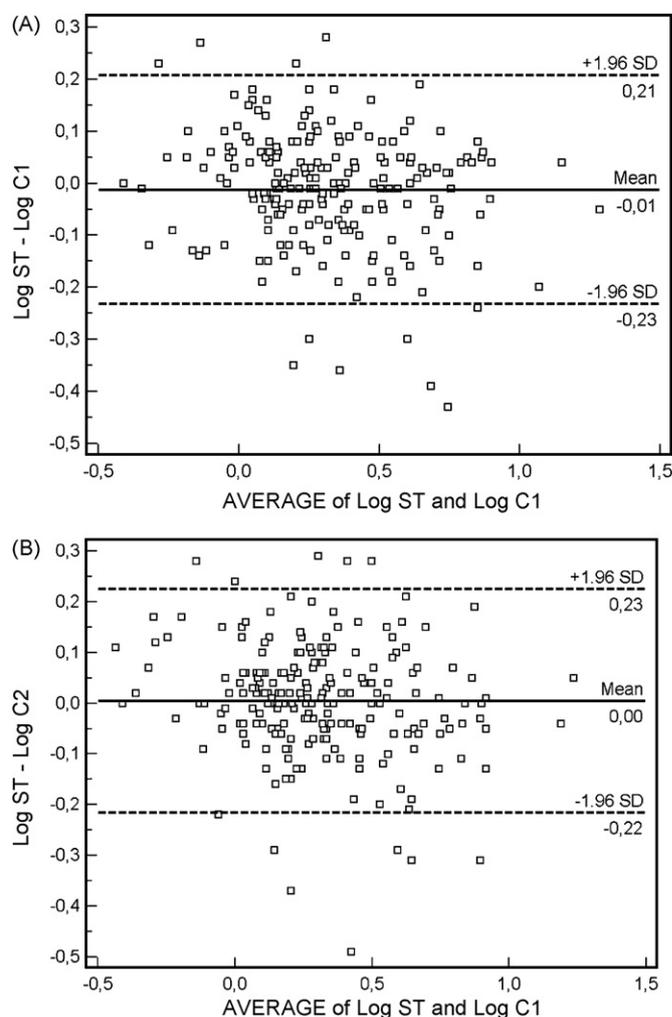
**Fig. 1.** Bland–Altman plot (*n* = 214). Graphs show the scatter plots of the difference between potencies against the average of the two potencies for each paired data point. (A) ST minus C1. (B) ST minus C2.

Table 3
 Categorization of results as “Pass” or “Fail to pass” the test, per group, according to the minimum potency requirements.

ST-C1-C2	n	%	Agreement
P-P-P	170	79.44	A (88.79%)
F-F-F	20	9.35	
F-P-F	2	0.93	D-I (1.40%)
F-F-P	1	0.47	
P-P-F	10	4.67	D-II (9.81%)
P-F-P	11	5.14	
Total	214		

ST = standard test; C1 = cage 1; C2 = cage 2. n = number of samples. P = pass the test. F = fail to pass the test. A = agree. D = disagree. I = false positive. II = false negative.

3.3. Concordance correlation coefficient

The concordance correlation coefficient of the results of the ST and C1 groups was 0.9279 (95% CI = 0.9072–0.9442), with a precision of 86.71% (r^2) and an accuracy of 99.65%. The CCC of the results of the ST and C2 was 0.9277 (95% CI = 0.9068–0.9441), with a precision of 86.43% (r^2) and an accuracy of 99.79%. Therefore, the results of both pairs of data were in “Excellent Agreement”.

3.4. Cohen’s Kappa index

The Cohen’s Kappa index was used to evaluate the agreement between results of the ST and C1 groups and the ST and C2 groups when the results were categorized as Pass or Fail to Pass. Table 3 shows the categorized data.

3.4.1. Agreement of results

One hundred ninety lots demonstrated a perfect agreement in the three groups. Twenty-three lots that originally failed to pass in the ST group were considered as true negative, and from these, 20 were in perfect agreement in the ST, C1 and C2 groups (Table 3).

A Cohen’s Kappa index of 0.7299 (Substantial) was obtained when the ST results were compared to the results of C1 and of 0.7714 (Substantial) when the ST results were compared with the C2 results (Table 4).

There were 24 contradictory results: three samples that failed to pass in the ST group passed the test in the C1 or C2 groups (false positives), and 21 samples passed in the ST group but failed to pass in the C1 or C2 groups (false negatives; Tables 3 and 4).

Of these contradictory results, the number of false positives was 2 of 214 (0.93%) in the C1 group and 1 of 214 (0.47%) in the C2 group. The number of false negatives was 11 of 214 (5.14%) in the C1 group and 10 of 214 (4.67%) in the C2 group. Table 5 shows the analysis of the contradictory Pass/Fail results.

Table 4
 Contingency tables for Cohen’s Kappa index calculation.

	ST Pass	ST Fail	Total
A			
C1 Pass	180	2	182
C1 Fail	11	21	32
Total	191	23	214
B			
C2 Pass	181	1	182
C2 Fail	10	22	32
Total	191	23	214

ST – standard test, C1 – cage 1, C2 – cage 2. A – ST × C1: index = 0.7299, standard error: 0.0672. B – ST × C2: index = 0.7714, standard error: 0.0672.

Table 5
 Difference between lower and upper confidence limits for potency values given as percentage of potency.

Group	n	LCL ^a	UCL ^b	Width ^c	Increase
ST	44	47.01	220.09	173.09	–
C1	44	39.03	272.76	233.72	35.03%
C2	44	39.78	258.25	218.47	26.22%

^a Mean % of potency lower confidence limit.
^b Mean % of potency upper confidence limit.
^c Difference between a and b.

3.4.2. Bayesian approach

The Kappa index was tested using a Bayesian approach, and a lower 95% one-sided confidence limit of 0.6193 and 0.6608 was obtained when the ST group was compared with the C1 or C2 group, respectively. Both values are greater than 0.60 (the highest value for a “Moderate Agreement” Kappa index), demonstrating that there was at least 95% confidence that the agreement between the ST group and either the C1 or C2 group was “Substantial” (see Section 2.5.3).

3.4.3. Retest simulation of contradictory results

As described in Section 2.2, vaccines that failed to pass the test are retested. In order to simulate a retest, the mean of the C1 and C2 groups was calculated, and the rates of false positives and negatives were re-evaluated. The number of contradictory results fell to 0 false positives and 3 (1.40%) false negatives in 214 samples (Table 6).

3.5. Effects on the 95% confidence interval

3.5.1. Effects on the 95% confidence Interval as percentage of potency results

Four of 51 lots (7.84%) in the C1 group and five of 51 lots (9.80%) in the C2 group failed to meet the WHO and Ph. Eur. requirements for confidence limits (25–400%), representing a total of seven lots that were excluded from the calculations. Fig. 2 com-

Table 6
 Contradictory results expressed in IU/dose and classified as “Pass” or “Fail to pass.”.

Sample	Vaccine	ST ^a	C1 ^a	C2 ^a	Mean C1 and C2 ^a	Results	False
1	SMB	0.68	0.40	1.11	0.76	F-F-P-F	Positive
2	SMB	0.78	1.03	0.53	0.78	F-P-F-F	
3	CCV	2.06	2.85	1.51	2.18	F-P-F-F	
4	SMB	1.00	1.51	0.93	1.22	P-P-F-P	Negative
5	SMB	1.31	1.50	0.76	1.13	P-P-F-P	
6	SMB	1.07	1.50	0.76	1.13	P-P-F-P	
7	SMB	1.33	1.93	0.91	1.42	P-P-F-P	
8	SMB	1.25	2.51	0.90	1.71	P-P-F-P	
9	SMB	1.22	1.71	0.92	1.32	P-P-F-P	
10	CCV	3.57	5.78	1.87	3.83	P-P-F-P	
11	CCV	2.54	3.57	1.87	2.72	P-P-F-P	
12	SMB	1.18	0.96	1.45	1.21	P-F-P-P	
13	SMB	1.34	0.93	1.89	1.41	P-F-P-P	
14	SMB	1.28	0.91	1.81	1.36	P-F-P-P	
15	SMB	1.02	0.90	1.12	1.01	P-F-P-P	
16	SMB	1.01	0.54	1.95	1.25	P-F-P-P	
17	SMB	1.39	0.91	1.70	1.31	P-F-P-P	
18	SMB	1.01	0.85	1.21	1.03	P-F-P-P	
19	SMB	1.00	0.93	1.14	1.04	P-F-P-P	
20	SMB	1.17	0.79	1.69	1.24	P-F-P-P	
21	SMB	1.12	0.87	1.52	1.20	P-F-P-P	
22	SMB	1.01	0.79	1.09	0.94	P-F-P-F	
23	CCV	2.50	2.50	1.90	2.20	P-P-F-F	
24	SMB	1.00	1.40	0.52	0.96	P-P-F-F	

SMB – Suckling Mouse Brain vaccine, minimum potency requirement = 1.0 IU/dose. CCV – Cell Culture vaccine, minimum potency requirement = 2.5 IU/dose. P – Pass the test. F – Fail to pass the test.

^a Potency in IU/dose.

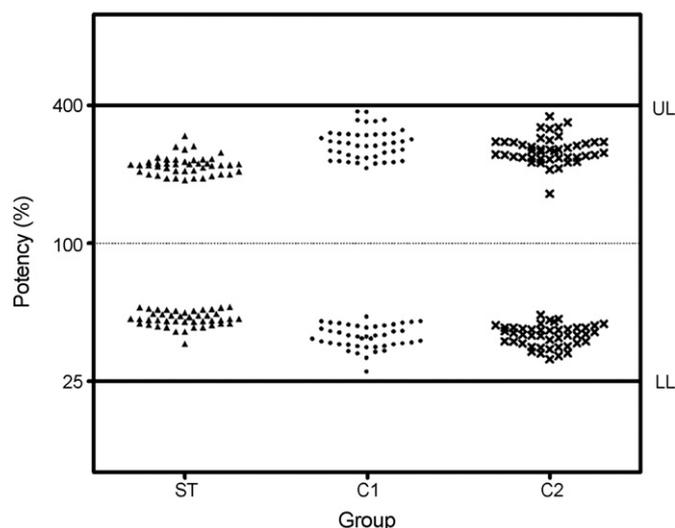


Fig. 2. The effect of the reduction in the number of animals per dilution on the NIH test potency results for rabies vaccine for human use. Vertical scatter diagrams of the percentage of potency plots for lower (LL) and upper (UL) confidence limits for the ST ($n = 44$), C1 ($n = 44$) and C2 ($n = 44$) groups.

compares the lower and upper 95% confidence limits, represented as a percentage of potency, of the three groups. A total of 44 lots were evaluated, and the means for the confidence limits are presented in Table 5. The increase in the width of the confidence limits was 35.03% for the C1 group and 26.22% for the C2 group when the difference between the mean of the lower and upper confidence limits was compared with those obtained with the ST group (Table 5).

In INCQS, using the standard NIH test over the last 5 years, the rate of statistically invalid assays due to confidence intervals that were outside of the specified range was 6.16%.

3.5.2. Minimum requirement for lower confidence limit of potency

As suggested by Weisser and Hechler (1997), the effect of adopting a “minimum requirement for lower confidence limit of the estimated potency” instead of using the confidence interval range of 25–400% was tested. Applying this concept, all of the potency assays that were considered invalid, even those presenting satisfactory potency results, became valid. The suggested minimum values

should be 0.625 IU/dose for cell culture vaccines (25% of 2.5 IU/dose) and 0.25 IU/dose for SMBV (25% of 1.0 IU/dose).

3.5.3. Effects on the 95% confidence interval of the reference vaccine ED50

The impact of the reduction in mouse number on the precision of the determination of the ED50 for the Brazilian reference vaccine lot BR006 ($n = 33$) was evaluated. While the effect on the mean value was not significant ($ST = 20.48$; $C1 = 21.26$ and $C2 = 22.42$), there was an increase in the width of the confidence limits of the ED50 ($C1 = 73.75\%$ and $C2 = 36.92\%$). This represents a reduction in the precision of the determination.

Fig. 3 plots the control charts for individual logarithmic ED50 values obtained in the ST group. The intermediate precision (inter-assay variation) was calculated using the ED50 results. The % CV was 43.09%, 69.49% and 61.34% in the ST, C1 and C2 groups, respectively.

3.6. Effects on linearity and parallelism

The incidence of statistically invalid assays due to non-linearity was 2 in 51 (3.92%) and 5 in 51 (9.8%) for the C1 and C2 groups, respectively. The incidence of statistically invalid assays due to non-parallelism was 4 in 51 (7.84%) and 1 in 51 (1.96%) for the C1 and C2 groups, respectively. The total number of statistically invalid assays due to non-linearity and/or non-parallelism was 6 in 51 (11.76%) in each group.

In INCQS, using the standard NIH test over the last 5 years, the rate of statistically invalid assays due to non-linearity was 1.68%, and the rate due to non-parallelism was 6.16%. The total rate of statistically invalid assays was 7.84%.

4. Discussion

The NIH mouse protection test is still the only potency test accepted by the WHO for the batch release of rabies vaccines for human use (WHO, 2007). This test requires a large number of animals and inflicts substantial suffering. Applying the 3Rs concept of Russell and Burch for the use of laboratory animals, we evaluated the impact of the reduction in the number of animals (from eighteen to nine per dilution) on the estimate of the potency according to the recommendations of Hendriksen et al. (1987), Hendriksen (2004), Weisser and Hechler (1997) and Bruckner et al. (1988, 2003).

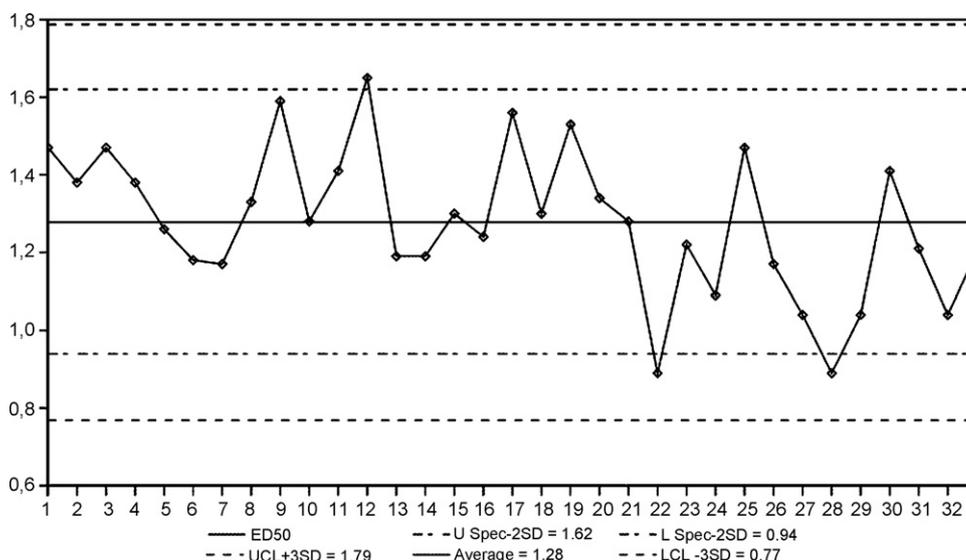


Fig. 3. Control chart of individual-x values for logarithm of ED50 for reference vaccine lot BR006.

This study is a retrospective analysis of data from routine vaccine potency assays for batch release.

All of the data sets (ST, C1 and C2) fit into a normal distribution, as determined using the Kolmogorov–Smirnov test. No significant differences were found between the mean of the three data sets when analyzed using the Student's *t* test for paired data.

The measurement error determined by the within-sample coefficient of variation (Bland, 2005) between the ST and C1 groups and between the ST and C2 groups was 25.29% and 23.32%, respectively. The within-sample coefficient of variation between the C1 and C2 groups was 39.47%. These results demonstrate an acceptable variability for an *in vivo* assay, since the WHO (1997a) states that *in vitro* and *in vivo* assays could present variability above 50%.

When the reference vaccine was evaluated, there was no significant increase in the mean ED50 (ST = 20.48, C1 = 21.26 and C2 = 22.42). However, there was a significant increase in the width of the confidence limits of the ED50 (C1 = 73.75% and C2 = 36.92%), which was a consequence of the reduction in the precision of the determination when the reference vaccine ED50 was calculated using nine animals per dilution. As the results of the reference vaccine can invalidate an entire test if some criteria are not fulfilled (e.g., linearity in the dose–response curve), in order to avoid an additional loss of precision in the test, we decided to keep using 18 animals per dilution for the reference vaccine in the NIH test. While the reduction in the number of animals tested was only applied to the test vaccine in the present study, as indicated by the mean ED50, the reduction can also be adopted to the reference vaccine.

The % CV of the ED50 for reference vaccine was 43.09% in 33 out of the 38 assays in the present study. In the Bruckner et al. (2003) study, the standard deviation in 24 NIH tests carried out with a reference vaccine was 45%, and in 38 NIH tests, it was 115%. The WHO (1997a) states that *in vitro* and *in vivo* assays could present variability above 50%.

The ST minus C1 and ST minus C2 results, when treated as repeated measures, presented no significant tendency for the amount of variation to change with the magnitude of the measurements in any of the two groups (Bland and Altman, 1986). Applying the identity approach as described by Petersen et al. (1997), the results from the repeated measures did not deviate from each other by more than the inherent imprecision of the assay, assuming a normal distribution of results, as determined using the chi-square test. This shows the good reproducibility of the results between the ST and C1 groups and between the ST and C2 groups.

The concordance correlation coefficient demonstrated “Excellent Agreement” between the results of the ST and C1 groups and between the ST and C2 groups, as classified by Warke et al. (2001), which demonstrate that NIH assay using nine animals per dilution can provide results comparable to those of the standard NIH test.

The Cohen's Kappa index of the categorized potency results (Pass or Fail) between the ST and C1 groups and between the ST and C2 groups demonstrated “Substantial Agreement” (Landis and Koch, 1977). A number of false negatives in the C1 (5.4%) and C2 (4.7%) groups and a very low occurrence of false positives in the C1 (0.9%) and C2 (0.5%) groups were observed.

Following the WHO guidelines (1997b), there should be less than 10% contradictory conclusions between an alternative simplified method and a standard test. The incidence of contradictory results in the C1 group was 6.3% and 5.2% in the C2 group, both significantly lower than 10%. According to our Standard Operative Procedures, all samples that fail to pass the test must be retested at least once and results are combined by weighted geometric mean. The weighted geometric mean value between the two potencies is considered, and if that mean passes the test, the sample passes the test. If that mean does not pass the test, one more repetition is performed, and the weighted geometric mean of the three results is considered the final result.

When this situation was simulated, using the C2 group as the retest of the C1 group, and vice versa, the number of contradictory results fell to zero false positives and 1.4% false negatives.

The precision of the potency values is indicated by the 95% confidence limits (Hendriksen et al., 1987). The *Ph. Eur.* and the WHO recommend a range of 25–400% for the confidence limits in the NIH test (Council of Europe, 2008b; WHO, 2007). In the present study, 4 in 51 samples (7.84%) in the C1 group and 5 in 51 samples (9.80%) in the C2 group failed to meet this requirement (25%–400%). Therefore, 8.8% (mean) of the assays were considered invalid as a consequence of the reduction in the number of tested animals. These results are in agreement with those obtained with the standard NIH test at the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde over the last 5 years (6.16% of invalid tests). These results also agree with those described by Hendriksen et al. (1987).

Weisser and Hechler (1997), in a critical review of the *Ph. Eur.* rabies vaccine monographs based on the 3Rs concept, suggested that instead of restricting the confidence interval to 25–400%, it would be more useful to stipulate a minimum value. This value should be exceeded by the lower confidence limit in order to guarantee suitable potency, as is the case for other potency tests (e.g., diphtheria, tetanus). This minimum value would be derived from the current requirements and is 0.625 IU/dose for cell culture vaccines (25% of 2.5 IU/dose). In the present study, when this concept was applied, all of the potency assays that were considered invalid, even those presenting satisfactory potency results, became valid. This demonstrates how the adoption of this concept would avoid re-testing vaccines that had already reached the minimum potency requirements in the first test.

The incidence of statistically invalid assays due to non-linearity and/or non-parallelism was 11.76% (6 in 51) for both the C1 and C2 groups. These results were in accordance with the WHO recommendation of less than 20% rejections due to deviations from either linearity or parallelism (WHO, 1997b). Hendriksen et al. (1987) reported 3 of 38 (7.89%) invalid assays due to non-parallelism or non-linearity in their study evaluating reductions in the animal number from 20 to 12 in order to evaluate the potency of diphtheria vaccine components.

Invalid assays due to these deviations are also frequent in the standard NIH test. At the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde over the last 5 years, 7.84% of the tests were deemed invalid due to non-linearity or non-parallelism. Therefore, the real increase in the number of invalid tests is 3.92%. As a practical example, if 18 animals were used per dilution (testing three dilutions = 54 animals per vaccine), for each 100 assays performed to test a single sample, based on a 7.84% rate of invalid assays, a total of 5822 mice would be used. If the number of mice were reduced to nine per dilution (testing three dilutions = 27 mice per vaccine), for each 100 assays performed to test one sample, based on an 11.76% rate of invalid assays, a total of 3018 mice would be used for the test vaccine. This represents a reduction of approximately 48% in the number of mice used. Applying this to the tests using 16 mice per dilution (also considering a 7.84% invalidation rate), this reduction would be about 42% for each tested vaccine.

Bruckner et al. (1988) stated that it would be not possible to reduce the number of mice used in the NIH test to less than 10 because this reduction would lead to results that would be much less precise. Weisser and Hechler (1997) suggested that the number of animals required for testing should be left open and that each laboratory could determine or confirm the number of animals that required to satisfy the requirements for a valid test. Additionally Weisser and Hechler (1997) suggested that there was evidence, based on the NIH test results for veterinary vaccines, that this number could be reduced to 10 animals per dilution.

The requirements for a valid test for veterinary vaccines are the same as those for rabies vaccines for human use, except that the minimum potency requirement for human vaccines (2.5 IU/dose) is greater than that used for veterinary vaccines (1.0 IU/dose) (Weisser and Hechler, 1997).

Even though a simplified single dilution NIH test is available, it only determines if the vaccine has a potency significantly higher than the required minimum. The single dilution NIH test does not provide full information on the validity of the determination of each individual potency, and it is only recommended for laboratories that have expertise in performing NIH multiple-dilution assays. Furthermore, if a batch of vaccine fails to meet the specifications set for the simplified test, a full NIH mouse protection test should be performed (WHO, 2007). Therefore, the simplified test is particularly useful for testing multiple batches of a vaccine within a short time. The WHO recommends that several prerequisites and conditions should be considered before adopting a single dilution assay (WHO, 2007). However, due to its lack of precision, the minimum potency requirement for vaccines tested by the modified test is higher than that for vaccines tested by the standard NIH test (Wilbur and Aubert, 1996). Bruckner et al. (2003) stated that must be recognized that this testing scheme may not be applicable to all the rabies vaccines on the market.

The results of this study indicate that the replacement of the standard NIH test by a variant of the assay using only nine mice per dilution of the vaccine seems to be feasible for routine potency assays. The tests using the lower number of mice provide results equivalent to the standard NIH test with full statistical information on the validity of each individual potency determination. If applied, this would result in a 42–48% reduction in the number of mice used, even considering a slight increase in the incidence of invalid assays.

The results also demonstrated that the adoption of a lower confidence limit of 25% of the estimated potency instead of a range for the confidence interval, as suggested by Weisser and Hechler (1997) and similar to what has been already established for comparable potency tests (e.g., diphtheria, tetanus, pertussis), would avoid re-testing vaccines that had already reached the minimum potency requirements in the first test.

5. Conclusion

This study, based on the retrospective statistical evaluation of data, indicates that a reduction from 18 mice to nine mice per dilution in the NIH test seems to be feasible and this number of mice is suitable to meet the statistical requirement for valid assays. However, further studies should be done in order to evaluate the inter-laboratory variability (reproducibility) of this alternative protocol.

As an illustration of the impact of such a reduction, the 11,556 mice used in the present study to determine the potency of the vaccines using the NIH mouse protection test would be reduced to 5778 using only nine mice per vaccine dilution for the test vaccines.

Acknowledgments

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil; Ministério da Saúde – Programa Nacional de Imunizações; Mr. David Le-Talec (Glaxo Smith Kline – Biologicals Rixensart, Belgium) for advise in statistical issues, Mrs. Eleonora Meira de Vasconcelos from Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, for English revision and Mr. Bertrand Poirier (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, Lyon, France) for the helpful discussion and suggestions upon statistical issues.

References

- Barth, R., Diderrich, G., Weinmann, E., 1988. NIH test, a problematic method for testing potency of inactivated rabies vaccine. *Vaccine* 6, 369–377.
- Bland, J.M., Altman, D.G., 1986. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1, 307–310.
- Bland, J.M., Altman, D.G., 1996. Statistics Notes: Measurement Error. *BMJ*, 313, 744. Available at: <http://www.bmj.com/cgi/content/full/313/7059/744>.
- Bland, J.M., 2005. How should I calculate a within-subject coefficient of variation? Available at: <http://www-users.york.ac.uk/~mb55/meas/cv.htm>.
- 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., 2003. Three Rs approaches in the quality control of inactivated Rabies vaccines. *ATLA* 31, 429–454.
- Bruckner, L., Palatini, M., Ackermann, M., Müller, H.K., Kihm, U., 1988. Reduction in the number of mice used for potency testing of human and animal rabies vaccines. *Experientia* 44, 853–857.
- Council of Europe, 2008a. Rabies vaccine (inactivated) for veterinary use (Monograph no. 0451). In: *The European Pharmacopoeia*, 6th ed., Strasbourg, France, pp. 790–792.
- Council of Europe, 2008b. Rabies vaccine for human use prepared in cell cultures (Monograph no. 0216). In: *The European Pharmacopoeia*, 6th ed., Strasbourg, France, pp. 836–838.
- Council of Europe, 2008c. Assays depending upon quantal responses. In: *The European Pharmacopoeia*, 6th ed., Strasbourg, France, pp. 580–582 (Chapter 4 – General texts).
- Farmacopéia Brasileira, Fascículo 5, 2004. 4a Edição, parte II – Vacina Contra Raiva Uso Humano, mon. 120. Atheneu Ed. São Paulo, SP.
- Fitzgerald, E.A., Gallagher, M., Hunter, W.S., Seligmann Jr., E.B., 1978. Use of the antibody assay in immunized mice for the determination of rabies vaccine potency. *Develop. Biol. Stand.* 40, 183–186.
- Griffiths, E., 1996. Assuring the quality of vaccines: regulatory requirements for licensing and batch release. In: Robison, A., Farrar, G., Wiblin, C. (Eds.), *Methods in Molecular Medicine: Vaccine Protocols*. Humana Press, USA, 269–288.
- Hendriksen, C.F.M., Spieser, J.M., Akkermans, A., Balls, M., Bruckner, L., Cussler, K., Daas, A., Descamps, J., Dobbelaer, R., Fentem, J., Halder, M., van der Kamp, M., Lucken, R., Milstien, J., Sesardic, D., Straughan, D., Valadares, A., 1998. Validation of alternative methods for the potency testing of vaccines. *ATLA* 26, 747–761.
- Hendriksen, C.F.M., 2007. Three Rs achievements in vaccinology. *AATEX* 14, 575–579, Special issue.
- Hendriksen, C.F.M., 2004. Reduction of numbers of animals used in the Quality Control of Biologicals. *ATLA* 32 (2), 53–58.
- Hendriksen, C.F.M., van der Gun, J.W., Marsman, F.R., Kreeftenberg, J.G., 1987. 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.* 15, 353–362.
- Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159–174.
- Lin, L.I.-K., 1989. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics* 45, 255–268.
- Lin, L.I.-K., 1992. Assay validation using the concordance correlation coefficient. *Biometrics* 48, 599–604.
- Lin, L.I.-K., 2000. Total deviation index for measuring individual agreement with applications in laboratory performance and bioequivalence. *Stat. Med.* 19, 255–270.
- McBride, G.B., 2005. Using Statistical Methods for Water Quality Management. Issues problems and solutions. In: *Cohen's Kappa for Dichotomous Variables*. John Wiley & Sons, New Jersey, 232–235.
- McVey, D.S., Galvin, J.E., Olson, S.C., 2003. A review of the effectiveness of vaccine potency control testing. *Int. J. Parasitol.* 33, 507–516.
- Metz, B., Hendriksen, C.F.M., Jiskoot, W., Kersten, G.F.A., 2002. Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. *Vaccine* 20, 2411–2430.
- OIE (Office International des Epizooties), 2004. Paris, France, Rabies, in *Manual of standards for diagnostic test and vaccines*. Available at: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A.00044.htm>.
- Petersen, P.H., Stöckl, D., Blaabjerg, O., Pedersen, B., Birkemose, E., Thienpont, L., Lassen, J.F., Kjeldsen, J., 1997. Graphical interpretation of analytical data from comparison of field method with reference method by use of difference plots. *Clin. Chem. Vol.* 43 (11), 2039–2046.
- van der Ark, A., Kappelle, I.S., Ólander, R.M., Enssle, K., Jadhav, S., Donk, H., Hendriksen, C.F.M., 2000. The Pertussis Serological Potency test collaborative study to evaluate replacement of the mouse protection test. *Biologicals* 28, 105–118.
- Warke, T.J., Kamath, S., Fitch, P.S., Brown, V., Shields, M.D., Ennis, M., 2001. The repeatability of nonbronchoscopic bronchoalveolar lavage differential cell counts. *Eur. Respir. J.* 18, 1009–1012.
- Wilbur, L.A., Aubert, F.A.M., 1996. The NIH test for potency. In: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*. World Health Organization, Geneva, pp. 360–368.
- Weisser, K., Hechler, U., 1997. Animal Welfare Aspects in the Quality Control of Immunologicals. A Critical Evaluation of Animal Tests in Pharmacopoeial monographs. *FRAME*, Nottingham, UK, 177–189.

World Health Organization, 1997a. WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2. Validation. Chapter 15. Validation of analytical assays. Geneva: pp. 69–73.

World Health Organization, 1997b. BLG 97.4. Manual of laboratory methods for potency testing of vaccines used in the WHO expanded program on immuniza-

tion. Chapter 27. Use and validation of a single vaccine dilution assay for testing the potency of Diphtheria, Tetanus and combined vaccines, pp. 162–174.

World Health Organization, 2007. Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs. WHO Technical Report Series, No. 941. Geneva, pp. 109–110.

7.3. Anexo 3.

Participação na Revisão das normas de produção e controle de vacina contra raiva de uso humano – OMS – Maio de 2003.

Annex 2

Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs

These Recommendations provide information and guidance to national regulatory authorities and vaccine manufacturers concerning the characterization, production and control of rabies vaccines in order to facilitate their international licensure and use. Each of the following sections constitutes a recommendation. The parts of each section that are printed in normal type have been written in the form of requirements so that if a national regulatory authority so desires these parts may be adopted as definitive national requirements. The parts of each section printed in small type are comments and additional guidance. It is recommended that modifications to these Recommendations be made only on condition that the modifications ensure that the vaccine is at least as safe and efficacious as that prepared in accordance with the Recommendations set out below.

In order to facilitate the international distribution of vaccine made in accordance with these recommendations, a summary protocol is given in the Appendix.

Introduction

General considerations

Part A. Manufacturing recommendations

- A.1 Definitions
- A.2 General manufacturing recommendations
- A.3 Control of source materials
- A.4 Control of vaccine production
- A.5 Filling and containers
- A.6 Control tests on final product
- A.7 Records
- A.8 Samples
- A.9 Labelling
- A.10 Distribution and shipping
- A.11 Stability, storage and expiry date
- A.12 Intradermal route of administration

Part B. Nonclinical evaluation of rabies vaccines

Part C. Clinical evaluation of rabies vaccines

Part D. National control requirements

- D.1 General
- D.2 Release and certification

Authors

Acknowledgements

References

Appendix

Summary protocol

preparation(s) calibrated against the International Standard. In addition, challenge virus standard should be obtained from a reliable source, stored and used as appropriate. The national regulatory authority should be able to provide the standard for potency testing as well as challenge virus standard on request (Part A, section 6.5).

D.2 Release and certification

A vaccine lot should be released only if it fulfils Part A of these Recommendations. Before any vaccine lot is released from a manufacturing establishment, the recommendations for consistency of production provided in *Guidelines for national authorities on quality assurance for biological products (32)* should be met.

A statement signed by the appropriate official of the national control laboratory should be provided if requested by a manufacturing establishment and should certify whether or not the lot of vaccine in question meets all national requirements, as well as Part A of these recommendations. The certificate should also state the lot number, the number under which the lot was released, and the number appearing on the labels of the containers. In addition, the date of the last satisfactory potency test as well as the expiry date assigned on the basis of shelf life should be stated. A copy of the official national release document should be attached.

The purpose of the certificate is to facilitate the exchange of rabies vaccine between countries. A model of a suitable certificate is given in the appendix.

Authors

The scientific basis for the revision of the Requirements published in 1981, 1987 and 1994 was developed at two meetings of the working group held at the World Health Organization, Geneva, in May 2003 and in May 2004 attended by the following people:

Dr H. Bourhy, Rabies Laboratory, National Reference Centre for Rabies, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Rabies, Pasteur Institute, Paris, France; Dr L. Bruckner, Institute of Virology and Immunoprophylaxis, Mittelhäusern, Switzerland; [Dr W. Correa de Moura](#), INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; Dr M. Ferguson, National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, England; Dr V. Grachev, Deputy Director, Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Moscow, Russian Federation; Dr R. Gibert, Laboratories and Controls Department, French Health Products Safety Agency, Lyon, France; Dr A. Kumar, Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA; Dr R. Levis, Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA; Dr L. Markoff, Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Rockville,

7.4. Anexo 4

Participação no estudo colaborativo para estabelecimento do 6º padrão Internacional de vacina contra raiva em 2007-2008.



WHO/BS/08.2087
ENGLISH ONLY

EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION
Geneva, 13 to 17 October 2008

**Report of the WHO collaborative study to calibrate a candidate
replacement for the Fifth International Standard for rabies vaccine**

Morag Ferguson¹, Alan Heath²
Division of Virology¹ and Biostatistics²
*National Institute for Biological Standards and Control, Blanche Lane, South Mimms,
Potters Bar, Herts, EN6 3QG, UK*

© World Health Organization 2008

All rights reserved. Publications of the World Health Organization can be obtained from WHO Press, World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland (tel.: +41 22 791 3264; fax: +41 22 791 4857; e-mail: bookorders@who.int). Requests for permission to reproduce or translate WHO publications – whether for sale or for noncommercial distribution – should be addressed to WHO Press, at the above address (fax: +41 22 791 4806; e-mail: permissions@who.int).

The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

The mention of specific companies or of certain manufacturers' products does not imply that they are endorsed or recommended by the World Health Organization in preference to others of a similar nature that are not mentioned. Errors and omissions excepted, the names of proprietary products are distinguished by initial capital letters.

All reasonable precautions have been taken by the World Health Organization to verify the information contained in this publication. However, the published material is being distributed without warranty of any kind, either expressed or implied. The responsibility for the interpretation and use of the material lies with the reader. In no event shall the World Health Organization be liable for damages arising from its use.

The named authors [or editors as appropriate] alone are responsible for the views expressed in this publication.

Appendix 1 Participants

Mr Paul Chamberlain NIBSC Blanche Lane South Mimms Herts EN6 3QG, UK	Dr Florence Cliquet/Dr Alexandre Servat AFSSA site de Nancy, LERRPAS Technopole Agricole et Veterinaire, BP 40009 54220 Malzeville France
Dr Wlamir Correa de Moura INCQS- Fiocruz Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro, RJ CEP 21045-900, Brazil	Dr Guanmu Dong National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products Tiantan xili 2, Beijing, 100050, China.
Dr S. Gairola Serum Institute of India Ltd., 212/2 Hadapsar Pune 411 028, India	Dr Richard Gibert/Dr S Morgeaux AFSSAPS 321 Avenue Jean Jaures 69007 Lyon cedex, France
Dr Rajesh Gupta Division of Product Quality OVRP/CBER Nicholson Lane Research Center 5516 Nicholson Lane Kensington, Maryland, 20892, USA,	Dr Ludolf Hoffmann/Dr Antje Schaefer Novartis Vaccines Department of Quality Control Building H21 Emil-von-Behring-Str. 76 35041 Marburg, Germany .
Mrs Teeranart Jivapaisampong Division of Biological Products, Department of Medical Sciences Ministry of Public Health, Amphur Muang, Nonthaburi 11000, Thailand	Dr. Alexander Kiktenko, Federal State Unitary Enterprise on Manufacture of Bacterial and Viral Preparations of Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis of Russian Acad. Med. Sci., Moscow, Russia
Dr. Heidi Meyer Paul-Ehrlich-Institut Paul-Ehrlich-Str. 51-59 63225 Langen Germany	Dr Jean-Claude Moulin/Dr Anne Lefebvre/ Dr Martine Chabaud-Riou/Dr Patrick Guyot Sanofi Pasteur 1541 avenue Marcel Merieux, building F4 69280 Marcy L'Etoile, France
Dr Artashes Movsesyants Tarashevich Institute 41 Sivtsev Vrazhek 119002 Moscow, Russia	Dr Charles Rupprecht/Dr Richard Franka Rabies Laboratory Center for Disease Control 1600 Clifton Road Atlanta GA30333. USA
Dr Dean Smith Biologic and Genetic Therapies Directorate, Centre for Biologics Evaluation, Health Canada, 100 De L' Eglantine Driveway., Tunney's Pasture, A/L: 0603C1 Ottawa, Ontario, Canada K1A 0K9	Dr Wilma Vergeer/Mrs D vd Merwe National Control Laboratory (Room 108) University of the Free State Swot street Bloemfontein 9300 South Africa