

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

Nathalia de Souza Machado

**PADRONIZAÇÃO DE UM LOTE DE VÍRUS RÁBICO FIXO DE DESAFIO (CVS)
PARA O ENSAIO DE POTÊNCIA DE VACINAS CONTRA RAIVA DE USO
HUMANO E VERIFICAÇÃO DO MÉTODO DE TITULAÇÃO VIRAL.**

Rio de Janeiro

2017

Nathalia de Souza Machado

**PADRONIZAÇÃO DE UM LOTE DE VÍRUS RÁBICO FIXO DE DESAFIO (CVS)
PARA O ENSAIO DE POTÊNCIA DE VACINAS CONTRA RAIVA DE USO
HUMANO E VERIFICAÇÃO DO MÉTODO DE TITULAÇÃO VIRAL.**

Trabalho de Conclusão de Curso
Apresentado ao Programa de Pós
Graduação em Vigilância Sanitária do
Instituto Nacional de Controle de Qualidade
em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz para
obtenção do título de Especialista Em
Vigilância Sanitária.

Tutor: Wlamir Corrêa de Moura
Wildeberg Cál Moreira
Preceptora: Michele Cardoso do Nascimento

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Machado, Nathalia de Souza

Padronização de um lote de vírus rábico fixo de desafio (CVS) para o ensaio de potência de vacinas contra raiva de uso humano e verificação do método de titulação viral. / Nathalia de Souza Machado – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2017.

49 f.: il., tab.

Trabalho de conclusão do curso (Especialista em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2017.

Preceptora: Michele Cardoso do Nascimento

Tutores: Wlamir Corrêa de Moura, Wildeberg Cál Moreira

1. Vacinas Antirrábicas. 2. Vírus da Raiva. 3. Titulometria. 4 Controle de Qualidade. I. Título

Nathalia de Souza Machado

**PADRONIZAÇÃO DE UM LOTE DE VÍRUS RÁBICO FIXO DE DESAFIO (CVS)
PARA O ENSAIO DE POTÊNCIA DE VACINAS CONTRA RAIVA DE USO
HUMANO E VERIFICAÇÃO DO MÉTODO DE TITULAÇÃO VIRAL.**

Trabalho de Conclusão de Curso Apresentado ao Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do título de Especialista Em Vigilância Sanitária.

Aprovado em 09 / 02 / 2017

BANCA EXAMINADORA

Renata Faria de Carvalho (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Lúcia Maria Corrêa Werneck (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Michele Cardoso do Nascimento (Mestre) - Preceptor
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Wlamir Corrêa de Moura (Doutor) - Tutor
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Wildeberg Cál Moreira (Mestre) - Tutor
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho a minha família que sempre foi a minha base e meu estímulo durante todo meu percurso.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades, e assim alcançar meus objetivos.

A minha mãe Sandra, a minha vó Glorinha, meu vô Leopoldo, meu irmão João Paulo, meu tio Sandro, pelo amor, incentivo e apoio incondicional, sempre acreditando nas minhas escolhas, apoiando-me mesmo nos momentos de dificuldades.

Ao Vitor pela compreensão, pelo auxílio e estímulo nos momentos mais difíceis, principalmente nesse final, que foi uma correria.

Ao meu tutor Wlamir que, de braços abertos, proporcionou a oportunidade de fazer parte do Laboratório de Vacinas Virais – Raiva, onde encontrei um ambiente familiar, com uma equipe de pessoas maravilhosas e onde obtive um vasto conhecimento que poderei levá-lo para minha vida profissional e pessoal.

Aos meus orientadores, Wlamir e Wildeberg e minha preceptora Michele pela dedicação, pelo suporte, pelo auxílio, pelas colaborações, pelas correções e incentivos.

A equipe do Laboratório da Raiva Djaildo e Ivani pelo auxílio e conhecimento compartilhado.

A equipe do Laboratório de Sangue e Hemoderivado – LSH, pela oportunidade no início da residência, pela gama de conhecimento fornecido ao longo dos 12 meses que participei da equipe e por todo incentivo até hoje ofertado.

Aos amigos Joice, Jorge, Karla, Marlon, Paola, Rafaelle e Sabrina, que foram um presente da Residência, pela troca de conhecimentos, pelas risadas, pelos desabafos e principalmente pela amizade.

E a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha formação e da minha torcida, o meu muito obrigado.

Que os vossos esforços desafiem as
impossibilidades, lembrai-vos de que
as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia
impossível

Charles Chaplin

RESUMO

A Raiva é uma antroponose viral infecciosa, altamente letal, transmitida por mamíferos e caracterizada como uma encefalite progressiva. É transmitida ao homem principalmente pela mordedura de cães infectados, com inoculação do vírus rábico presente na saliva. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a infecção cause dezenas de milhares de mortes a cada ano nos países em desenvolvimento. No Brasil, o ciclo urbano vem sendo controlado, mas a Raiva ainda é endêmica. A prevenção consiste na aplicação da vacina, em pessoas expostas ao contato com o vírus, além da vacinação de cães e gatos, principais transmissores da doença. As vacinas modernas de cultivo celular são altamente eficazes na prevenção da doença, mas, como produtos biológicos necessitam de rigoroso controle da qualidade antes do uso. O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) é o Laboratório Nacional de Controle responsável pela liberação de lotes de imunobiológicos, realizado lote a lote, baseado em normas oficiais, pela análise documental e de ensaios laboratoriais. O controle visa garantir que cada lote apresente a mesma consistência de lotes que demonstraram eficácia. A potência das vacinas contra raiva é avaliada pelo teste NIH, um teste de desafio em camundongos. Os animais são imunizados com diferentes diluições da vacina e posteriormente submetidos a um desafio com vírus padrão. Após o desafio, a potência relativa pode ser calculada, sendo o requerimento mínimo 2,5 UI/dose. A produção e padronização dos lotes de vírus desafio são fundamentais na garantia da qualidade do ensaio NIH e devem atender a requisitos estabelecidos pela OMS como um valor de DL50 mínimo de $10^{6,0}$, homogeneidade e estabilidade. O presente trabalho descreve a padronização e o controle de um lote de vírus trabalho (VT15) e a verificação do método de titulação do vírus. Os ensaios foram realizados seguindo orientações da OMS como descrito no Procedimento Operacional Padrão (POP) do INCQS. O título do lote foi padronizado como $10^{7,12}$. Apesar das variações ocorridas nos valores dos títulos, os mesmos se mantiveram dentro do requerimento mínimo. Os valores dos títulos obtidos foram lançados em gráficos de controle para realização do controle sistemático do lote. Observou-se que apesar da ocorrência de variações e tendências não aleatórias, o vírus manteve-se dentro dos intervalos de 99% de controle. Os ensaios compendiais são aceitos como validados não necessitando ser submetidos a processos de validação, no entanto é necessário realizar uma validação reduzida, denominada verificação, para demonstrar que o método apresenta as características necessárias ao seu uso. A verificação do ensaio de titulação do vírus rábico foi realizada para os parâmetros veracidade e precisão, visando a demonstração de sua confiabilidade. Não existem critérios de aceitação estabelecidos para validações de ensaios/produtos biológicos, já que apresentam alta variabilidade, entretanto, adotamos empiricamente, a variabilidade máxima de 20% recomendada para ensaios imunoenzimáticos para veracidade e precisão. Os resultados demonstraram ser precisos e com veracidade conforme e apesar das flutuações do título do vírus, eles se mantiveram nos limites esperados.

Palavras Chave: Raiva. Vacina. Titulação Viral

ABSTRACT

Rabies is a highly lethal, infectious viral anthroponosis transmitted by mammals, characterized as a progressive encephalitis. It is transmitted to man mainly by the bite of infected dogs, with inoculation of the rabies virus present in saliva. The Organização Mundial da Saúde (OMS) estimates that the infection causes tens of thousands of deaths each year in developing countries. In Brazil, the urban cycle has been controlled, but rabies is still endemic. Prevention consists in the application of the vaccine, in people exposed to Rabies virus, in addition to vaccination of dogs and cats, the main transmitters of the disease. Modern cell culture vaccines are highly effective in preventing the disease, but as biological products, require strict quality control prior to use. The Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) is the National Control Laboratory in charge of release lots of immunobiological, carried out lot by lot, based on official guidelines, through review of summary protocols and laboratory tests. The control aims to ensure that each batch presents the same consistency of batches that have demonstrated efficacy. The potency of rabies vaccines is evaluated by the NIH test, a challenge test in mice. The animals are immunized with different dilutions of the vaccine and thereafter submitted to a virus challenge. After the challenge, the relative potency can be calculated and the minimum requirement is 2.5 IU/dose. The production and standardization of batches of challenge virus are critical in ensuring the quality of the NIH assay and must meet WHO established requirements as a minimum LD₅₀ value of 10^{6.0}, homogeneity and stability. The present work describes the standardization and control of a batch of working virus (VT15) and the verification of the virus titration method. Assays were performed following WHO guidelines as described in INCQS Standard Operating Procedure (POP). The standardized viral titer in LD₅₀ log 10^{7.12}. Despite the variations in titers values, they remained within the minimum requirement. The values of the titers obtained were plotted in control charts for the systematic control of the lot. It was observed that despite the occurrence of non-random variations and trends, the virus remained within the 99% control intervals. The compendial tests are accepted as validated and do not need to undergo validation procedures, however a reduced validation, called verification, may be necessary to demonstrate that the method has the characteristics needed for its use. The verification of the rabies virus titration assay was performed for the parameters trueness and precision, in order to demonstrate its reliability. There are no established acceptance criteria for validation of biological assays / products, since they have high variability, however, we adopted empirically the maximum variability of 20% recommended for enzyme immunoassays for trueness and precision. The results presented Trueness and precision in accordance to the acceptance criteria, and despite fluctuations in the virus titer, they remained within the expected range.

Key words: Rabies. Vaccine. Viral Titration

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Mapa mundial demonstrando países com presença e ausência de raiva humana transmitida por cães 15
Figura 2	Número total de casos de raiva humana no Brasil de 1990 a 201616
Figura 3	Evolução da Raiva Humana transmitida por cães e morcegos no Brasil, de 1990 a 2016 17
Figura 4	Crescimento da população canina no Brasil ao longo das décadas 20
Quadro 1	Parâmetros necessários para a validação de método analítico, segundo natureza do ensaio..... 24
Figura 5	Esquema de diluição do vírus trabalho para ensaio de titulação 30
Figura 6	Gráfico de controle obtido pelo software SPC Explorer RT demonstrando o comportamento do vírus (tendência) com base em seu título 38
Figura 7	Gráfico de controle obtido pelo software SPC Explorer RT demonstrando o comportamento do vírus (tendência) com base na média dos títulos de cada um dos sete ensaios 39
Figura 8	Gráficos de controle obtidos pelo software SPC Explore RT comparando o comportamento (tendência) do VT15 e VT14 com base em seu título 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Títulos virais expressos em logaritmo da DL50 por amostra testadas	36
Tabela 2	Títulos virais expressos em logaritmo da DL50 de cada amostra, dos sete ensaios realizados, médias dos títulos e média do título inicial baseado nos 3 primeiros ensaios	37
Tabela 3	Verificação - Parâmetro Veracidade	41
Tabela 4	Verificação – Parâmetro Precisão	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CEME	Central de Medicamentos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CVS	<i>Challenge Virus Standard</i>
CV	Coeficiente de Variação
DE	Dose Efetiva
DL50	Dose Letal 50%
DP	Desvio Padrão
DR.	Doutor
e.g.	<i>Exempli Gratia</i>
EPI	Equipamentos de Proteção Individual
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
GC	Gráfico Controle
HDCV	Vacinas Células Diplóides Humanas
HRIG	Imunoglobulina Antirrábica Humana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
i.c.	Intracerebral
ICH	<i>International Council for Harmonisation</i>
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
IEC	<i>International Electrotechnical Commission</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
Ig	Imunoglobulina
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INPP	<i>Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis</i>
kg	Quilograma

LIC	Limite Inferior de Confiança
LSC	Limite Superior de Confiança
log	Logaritmo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitro
NR	Não Realizado
MS	Ministério da Saúde
NIH	<i>National Institute of Health</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PCECV	Vacinas Purificadas de Embrião de Galinha
Ph. Bras.	Farmacopeia Brasileira
PNPR	Programa Nacional de Profilaxia da Raiva
POP	Procedimento Operacional Padrão
PVCV	Vacinas Purificadas de Células Vero
RE	Resolução
SAL	Serviço de Animais de Laboratório
SAR	Soro antirrábico
TECPAR	Instituto de Tecnologia do Paraná
TR	Tendência Relativa
UI	Unidade Internacional
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
VERO	Célula de Rim de Macaco Verde Africano
VT	Vírus Trabalho
µg	Micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 A RAIVA	14
1.2 RAIVA HUMANA NO BRASIL	15
1.3 IMUNOBIOLOGICOS PARA RAIVA	17
1.4 VACINA ANTIRRÁBICA NO BRASIL	18
1.5 CONTROLE DA QUALIDADE DE IMUNOBIOLOGICOS PARA RAIVA NO BRASIL	20
1.6 DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DA VACINA ANTIRRÁBICA.....	21
1.7 LOTE DE VÍRUS DESAFIO	21
1.8 GRÁFICOS DE CONTROLE	22
1.9 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS	23
2 RELEVÂNCIA	26
3 OBJETIVO GERAL	27
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4 METODOLOGIA	28
4.1 VÍRUS TRABALHO LOTE VT15	28
4.2 BIOSSEGURANÇA	28
4.3 PREPARO DAS DILUIÇÕES	29
4.4 ANIMAIS	30
4.5 INOCULAÇÃO	31
4.6 PERÍODO DE OBSEVAÇÃO	31
4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	31
4.8 DESENHO DO ESTUDO	32
4.8.1 Padronização do título do lote de vírus de desafio	32
4.8.2 Controle sistemático do lote – gráficos de controle	33
4.8.3 Verificação do ensaio de titulação viral em camundongos	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 TITULAÇÃO DO VÍRUS	35
5.2 CONTROLE SISTEMÁTICO DO LOTE	37
5.3 VERIFICAÇÃO DO ENSAIO DE TITULAÇÃO VIRAL EM CAMUNDONGOS	40

6 CONCLUSÃO	43
6.1 PADRONIZAÇÃO DO TÍTULO DO VT 15	43
6.2 CONTROLE SISTEMÁTICO DO LOTE VT15	43
6.3 VERIFICAÇÃO DO ENSAIO	43
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

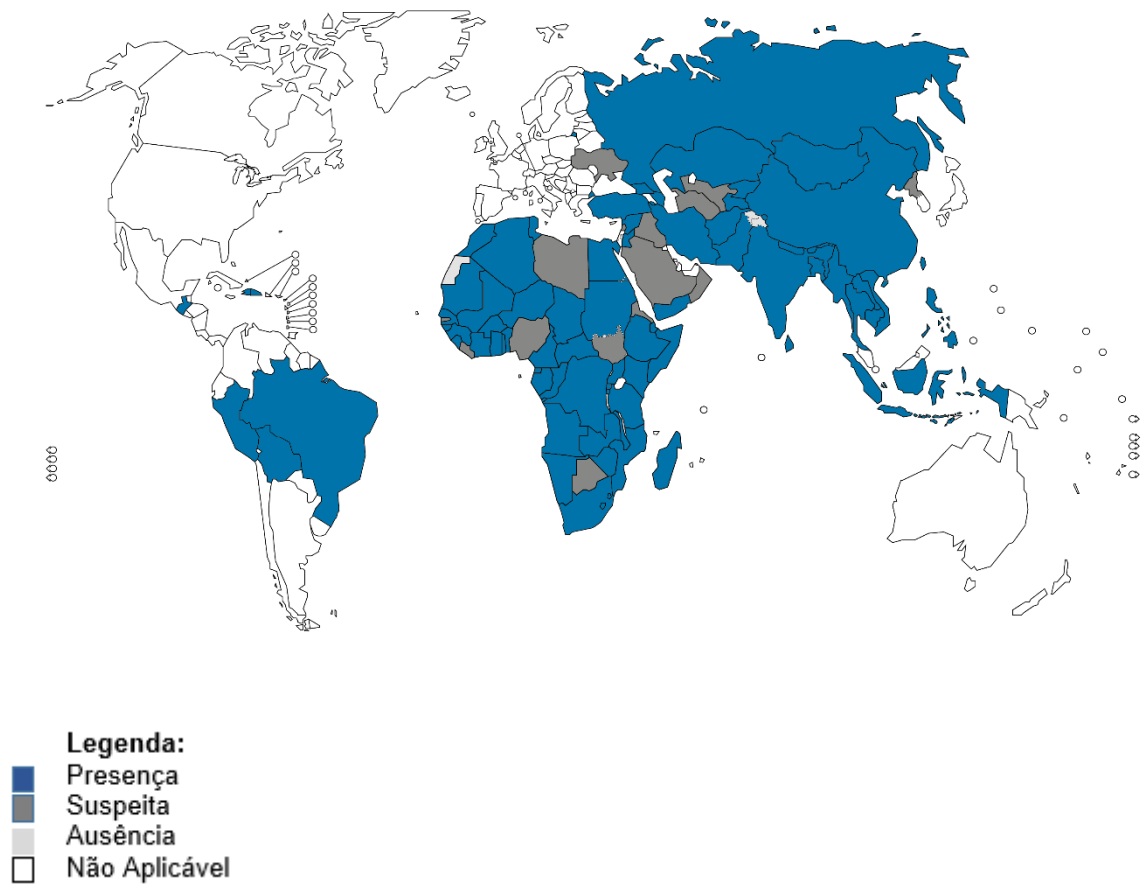
1.1 A RAIVA

A Raiva (*rabhas*, Sânscrito: cometer violência) é uma antropozoonose infecciosa viral, de caráter agudo, quase sempre fatal, caracterizada como uma encefalite progressiva. É transmitida ao homem pela inoculação do vírus rábico presente na saliva de mamíferos infectados, principalmente por meio da mordedura e, mais raramente, pela arranhadura e lambadura de mucosas e/ou pele lesada (BRASIL, 2011a).

É uma doença cosmopolita, sendo encontrada em 150 países e em todos os continentes, exceto na Antártida (OMS, 2016a). Embora tenha sido uma das primeiras doenças humanas a ter uma vacina experimentalmente desenvolvida usada com sucesso em 1885 (VODOPIJA & CLARCK, 1991), segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), anualmente, a Raiva mata dezenas de milhares de pessoas, a maioria crianças menores de 15 anos, em países em desenvolvimento, principalmente na África e na Ásia. Diante disso, mais de 15 milhões de pessoas recebem profilaxia pós-exposição todos os anos (OIE, 2016; OMS, 2016b). A OMS estima que 99% dos casos de raiva humana sejam transmitidos pela mordedura de cães infectados (OMS, 2016c). A Figura 1 apresenta a distribuição da Raiva transmitida por cães no mundo no período de 2010 a 2014.

Com base na Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), foram registrados 2.285 casos humanos nas Américas entre os anos de 1990 e 2016 (até novembro) (OPAS, 2016).

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



Fonte: Adaptado Organização Mundial da Saúde - OMS, 2014¹.

1.2 RAIVA HUMANA NO BRASIL

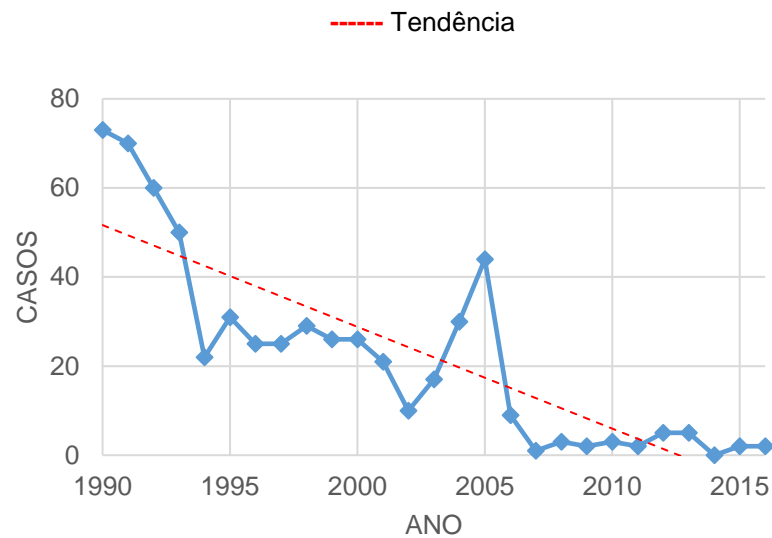
No Brasil, a Raiva é ainda considerada endêmica e no período compreendido de 1990 a 2016 foram registrados 593 casos de raiva humana, com uma média de três casos/ano na década atual. É importante salientar que nos anos de 2004 e 2005, a região da Bacia Amazônica, entre os estados do Pará e Maranhão, vivenciou um

¹ Disponível em:

<http://www.who.int/rabies/Presence_dog_transmitted_human_Rabies_2014.png?ua=1>. Acesso em: dez 2016.

surto de raiva humana transmitida por morcegos, o que acarretou na alteração da tendência da doença, fazendo com que houvesse o aumento do número de casos de raiva. Entretanto, após esse período a doença volta a demonstrar uma fase de controle (Figura 2). A região Nordeste apresenta uma maior fragilidade a surtos ou casos de raiva humana, apresentando 56,83% dos casos no país, enquanto que na região Sul, desde 1987 não existem relatos da doença (BRASIL, 2016)

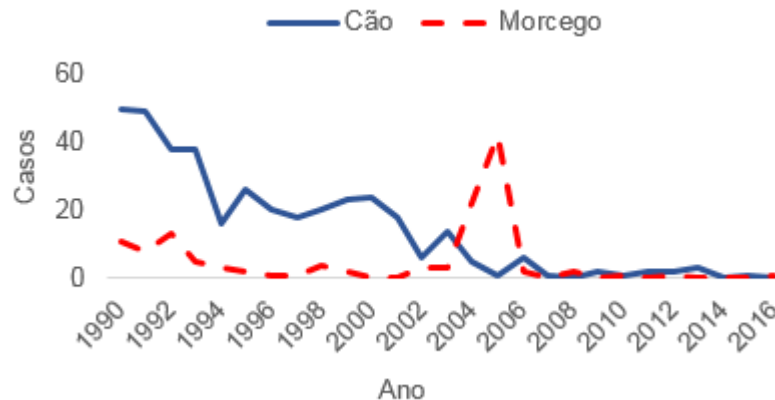
Figura 2 – Número total de casos de raiva humana no Brasil de 1990 a 2016.



Fonte: Secretaria de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde – BRASIL, 2016

Até o ano de 2003, a principal espécie transmissora da raiva humana no Brasil foi o cão. Nos anos de 2004 e 2005 o morcego passou a ser considerado a principal fonte de transmissão no país, devido ao surto de raiva nas regiões Norte (Pará) e Nordeste (Maranhão). Após esses anos, observa-se que o cão retorna como o principal animal transmissor ao homem (Figura 3). De 1990 a 2016 o cão foi responsável por 384 casos, representando 64,75%, enquanto que os morcegos, 127 casos, representaram 21,42% dos casos da doença no homem (BRASIL, 2016).

Figura 3 – Evolução da Raiva Humana transmitida por cães e morcegos no Brasil, de 1990 a 2016.



Fonte: Secretaria de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde – BRASIL, 2016.

No Estado do Rio de Janeiro, o último caso de raiva humana registrado ocorreu no final de 2006, na zona rural de São José do Vale do Rio Preto (Região Serrana), sendo transmitida por morcego hematófago (BRASIL, 2016; OPAS, 2016). O último caso transmitido por cão foi em 1985. No entanto o vírus continua circulando no Município do Rio de Janeiro, entre os anos de 2001 e 2010, o laboratório do Instituto Municipal de Veterinária Jorge Vaitsman recebeu 135 morcegos não hematófagos para o diagnóstico da raiva, onde 11 (8,14 %) resultaram positivos para a doença (CABRAL et al., 2012).

1.3 IMUNOBIOLOGICOS PARA RAIVA

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

No entanto, a vacinação pós-exposição pode não ser suficiente para evitar a infecção, especialmente em casos de exposição grave (categoria 3), onde a

imunização passiva concomitante com Imunoglobulinas (Ig) G é fortemente recomendável (OMS, 2007).

O requerimento de potência para as vacinas produzidas em cultivo celular, descrito na Farmacopeia Brasileira (Ph. Bras.), é de 2,5 UI/dose (FARMACOPEIA, 2010). A dose é de 0,5 ml para a vacina em células Vero tanto para o regime pré-exposição quanto para o pós-exposição. As vacinas contra Raiva induzem uma resposta imune ativa que inclui a produção de anticorpos vírus-neutralizantes. A produção de anticorpos leva aproximadamente de 7 a 10 dias para ocorrer e os anticorpos neutralizantes detectáveis contra o vírus rábico podem persistir por vários anos (VODOPIJA & CLARK, 1991).

No Brasil são utilizados dois tipos de IgG contra raiva, as heterólogas ou soro antirrábico (SAR), na dose 40 UI/kg de peso, consistindo de frações F(ab')₂ altamente purificadas, produzidas a partir de Ig de origem equina; e as homólogas, a Ig antirrábica humana (HRIG), na dose 20 UI/kg de peso (OMS, 2016d). A administração de Ig antirrábica é feita para prover anticorpos vírus-neutralizantes durante o tempo entre a administração da vacina e a produção de anticorpos. O uso de imunoglobulinas antirrábicas provê uma rápida imunidade passiva que persiste por um curto período de tempo (CABASSO et al., 1971). No país o SAR é produzido pelo Instituto Butantan, pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e pelo Instituto Vital Brazil e as homólogas são importadas, apenas para casos onde haja reação à Ig equídea (MOURA, 2009).

1.4 VACINA ANTIRRÁBICA NO BRASIL

A história da luta contra a Raiva no Brasil é antiga. Em fevereiro de 1888, meses antes da inauguração do Instituto Pasteur de Paris, Dom Pedro II já havia fundado o Instituto Pasteur do Rio de Janeiro, ambos criados 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 SÃO PAULO, 2016).

Como a raiva urbana permanecia endêmica no Brasil por muito tempo, em 1973, ano de criação do Programa Nacional de Imunizações (PNI), foi também criado

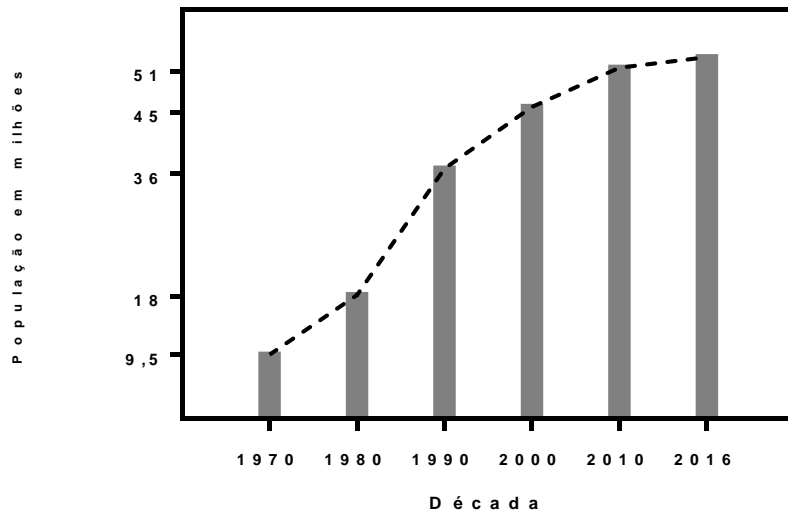
o Programa Nacional de Profilaxia da Raiva (PNPR), mediante convênio firmado entre os Ministérios da Saúde (MS), da Agricultura (atual Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA), Central de Medicamentos (CEME) e a Organização Pan-Americana de Saúde (OMS-OPAS) com o objetivo de reduzir o número de casos de raiva humana pela aplicação de medidas sistemáticas de controle da doença nos animais domésticos e profilaxia nas pessoas expostas ao risco de contrair a doença (SCHENEIDER et al., 1996).

Apesar de introduzida no Brasil em 1965, a vacina Fuenzalida (FUENZALIDA & PALÁCIOS, 1955), somente foi escolhida, dentre as várias vacinas até então produzidas no Brasil, no ano de 1973 como a melhor que atenderia às exigências do PNPR, sendo produzida, a partir daí, com a adoção da inativação pela beta-propiolactona e adotando testes e padrões para o controle da qualidade de sua produção (SILVA et al., 1967; MARKUS et al., 1971). Apesar de toda discussão a respeito de efeitos colaterais causados por tal classe de vacina, esta foi utilizada em grande escala em humanos até 2003 e em cães e gatos até o início da década de 2010, permitindo que a Raiva fosse controlada com êxito na maior parte do País (MOURA, 2009).

A partir do ano de 2000, o estado de São Paulo iniciou a utilização da vacina purificada produzida em células Vero de uso humano (VERORAB, Aventis Pasteur, França). Os demais estados continuaram utilizando a vacina produzida em cérebro de camundongos lactentes fabricada pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) até 2003. Neste ano o Instituto Butantan passou a importar e fornecer a vacina purificada em células Vero ao MS, como fruto de um acordo de transferência de tecnologia com a Sanofi Pasteur (na época, Aventis Pasteur), produtora francesa da vacina (MOURA, 2009). Nas figuras 2 e 3 fica evidente a significativa diminuição do número de casos de raiva humana após a introdução da vacina de cultivo celular em 2003, quando não considerados os casos por morcegos de 2004 e 2005 ocorridos na Bacia Amazônica.

A endemia de raiva gera um alto custo em assistência médica (CALDAS, 2015) e apesar do *status* de controle da doença, este aumento se deve a mudanças em fatores como o tipo de relação homem/cão e ao próprio crescimento das populações humana e canina (Figura 4).

Figura 4 – Crescimento da população canina no Brasil ao longo das décadas.



Fonte: Elaborado pela autora com dados da OMS e IBGE sobre população canina e humana, 2016.

1.5 CONTROLE DA QUALIDADE DE IMUNOBIOLOGICOS PARA RAIVA NO BRASIL

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) é o órgão oficial responsável pelo controle da qualidade dos imunobiológicos no Brasil, desde a sua fundação em 1983. Esse controle é realizado lote a lote, baseado em normas oficiais, análises documentais dos protocolos de produção e de ensaios laboratoriais. Tais análises possuem como propósito verificar os requisitos mínimos exigidos nas normas oficiais garantindo que cada lote apresente a mesma consistência de lotes que demonstraram eficácia. Somente depois de garantidas sua segurança, potência e estabilidade, é liberado para uso (NETTO et al., 2011).

Dentre os ensaios biológicos preconizados para o controle de vacinas inativadas contra Raiva e soros antirrábicos, os mais importantes são os ensaios de potência para vacina e soro. Tal importância se deve ao fato da potência das vacinas e soros estar diretamente ligada à eficácia do produto. Um produto sub potente aumenta as chances de ocorrerem falhas de proteção na população alvo.

1.6 DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DA VACINA ANTIRRÁBICA

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 de camundongos vêm sendo utilizados para a determinação da potência da vacina antirrábica humana (VODOPIJA & CLARK, 1991).

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

Desde 1987, o INCQS avalia a potência das vacinas antirrábicas inativadas de uso humano pelo ensaio NIH. O ensaio consiste em submeter diferentes grupos de camundongos a duas imunizações, com intervalos de sete dias entre elas, com diluições crescentes da vacina teste e da vacina de referência. Os camundongos são desafiados 14 dias após a primeira imunização, com uma mesma dose contendo de 10 a 50 dose letal 50% (DL50) (e.g 32 DL50) de vírus padrão de desafio (CVS) por via intracerebral (i.c.). Após 14 dias do desafio, determina-se a dose efetiva (DE) capaz de proteger 50% dos camundongos vacinados e a partir desta é possível calcular a potência relativa (DE50 de uma vacina teste dividida pela DE50 de uma vacina de referência). O requerimento mínimo de potência é de 2,5 UI/dose (WILBUR & AUBERT, 1996; FARMACOPEIA, 2010).

1.7 LOTE DE VÍRUS DESAFIO

Para a realização do ensaio de potência NIH é necessária a produção de um lote homogêneo de vírus rábico da cepa padrão de desafio – CVS. A produção e padronização de lotes de vírus desafio são consideradas pontos fundamentais na

garantia da qualidade do ensaio NIH. Assim, para que o vírus seja considerado conforme em sua utilização no ensaio para o controle da qualidade das vacinas antirrábicas é necessário que atenda a requisitos estabelecidos pela OMS dentre eles:

- Possuir um título mínimo de 10^6 DL50/0,03 mL i.c. em camundongos (WILBUR & AUBERT, 1996);
- De teste para teste, a variação máxima no título obtido não deve exceder uma diluição decimal, quando o lote for usado (WILBUR & AUBERT, 1996);
- Possuir estabilidade, demonstrando título conforme durante o período de seu uso (WILBUR & AUBERT, 1996).

1.8 GRÁFICOS DE CONTROLE

Gráficos de controle (GC) consistem da representação de dados (de categoria atribuída ou variável) ao longo do tempo. Essa ferramenta permite avaliar o comportamento de um determinado processo, identificar a presença de causas especiais atuando no processo e fundamentar ações preventivas e/ou corretivas, quando necessário visando a melhoria do processo (ISO, 2013).

Um processo está sob controle estatístico, ou simplesmente "sob controle", quando os resultados de variabilidade só ocorrem devido a causas aleatórias. Uma vez que este nível de variação é alcançado, qualquer desvio em relação a este nível é assumido como sendo o resultado de causas especiais (atribuíveis) que devem ser identificadas e eliminadas (ISO, 2013).

A aplicação dos GC no controle da qualidade de vacinas foi inicialmente descrita por BATSON et al. (1951). Um mínimo de 20 resultados de dados de cada parâmetro da qualidade deve ser obtido e a média, o desvio padrão (DP), média e ± 2 e 3 valores do desvio padrão para esses dados devem ser calculados. No caso de 20 pontos de resultados não estarem disponíveis, as tendências podem ser avaliadas usando o número máximo de pontos de dados/valores disponíveis. Estas estimativas podem ser revistas em uma base regular ou quando mais dados estiverem disponíveis e os novos valores acumulados puderem ser usados para rever as tendências previamente estabelecidas, até um mínimo de 20 pontos de dados/valores estarem

completos. Posteriormente, todos os valores devem estar dentro destes valores estabelecidos e os comentários devem ser feitos com base neles (ISO, 2006).

Os limites de controle ($0,999 = 3 \text{ DP}$) e de alerta ($0,975 = 2 \text{ DP}$) para a média e o DP são definidos estatisticamente pela probabilidade de um ponto encontrar-se dentro dos limites quando o processo está sob controle (ISO, 2006).

1.9 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Sistemas de garantia da qualidade como as Boas Práticas de Fabricação - BPF (*Food and Drug Administration* - FDA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA) e a *International Organization for Standardization/International Electrotechnical Commission* (ISO/IEC) determinam que os ensaios utilizados no controle da qualidade de produtos, devem ser propriamente validados. Na área Farmacêutica, validações são conduzidas seguindo as orientações do *International Council for Harmonization* ICH Q2 (R1) (ICH, 2005).

O documento ICH Q2 (R1) parte II, afirma que devido à natureza complexa dos procedimentos analíticos para produtos biológicos e biotecnológicos, estes podem em alguns casos ser validados com outras abordagens não previstas por ele.

As titulações de vírus apresentam problemas de variação comuns a todos os sistemas de ensaios biológicos (ICH, 1999). E sendo assim para garantir a confiabilidade dos resultados é necessário seguir alguns parâmetros para serem validados (OMS, 1997).

A variação pode surgir dentro de um ensaio como resultado de erros de diluição, efeitos estatísticos e diferenças dentro do sistema de ensaio que são desconhecidos ou difíceis de controlar. Estes efeitos são provavelmente maiores quando comparados diferentes corridas de ensaio (variação entre ensaios) do que quando são comparados resultados dentro de uma corrida de ensaio único (variação intra ensaio) (ICH, 1999).

A validação consiste em uma avaliação sistemática, experimental e documentada, de uma metodologia analítica com o intuito de demonstrar que a mesma atende às necessidades de sua aplicação. Deve garantir que seja

reprodutível, exata para a finalidade a que se pretende e garantir a confiabilidade de seus resultados (OMS, 2006; BRASIL, 2011b).

As metodologias descritas em farmacopeias ou formulários oficiais, reconhecidos pela ANVISA, são consideradas validadas, no entanto, uma validação reduzida, então denominada verificação, deve ser realizada para garantir que o método apresenta confiabilidade e relevância adequadas. As metodologias analíticas não compendiais, só poderão ser utilizadas após um estudo de validação mais completo, avaliando os parâmetros adequados à natureza de ensaio como descrito no Quadro 1 (BRASIL, 2003).

Quadro 1 - Parâmetros necessários para a validação de método analítico, segundo natureza do ensaio.

Parâmetro Categoria	I Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias- prima	II Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias- prima		III Testes de performance	IV Teste de identificação
		Quantitativo	Ensaio Limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

Fonte: Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003

Neste processo é necessário a utilização de substâncias de referência oficiais (Ph. Bras., Farmacopeia Americana - USP ou outros códigos autorizados) e na ausência destas, é possível o uso de padrões de trabalho, desde que a identidade e

o teor sejam adequadamente comprovados. Outro fator importante para garantir a qualidade analítica dos resultados é que os equipamentos utilizados na validação estejam calibrados adequadamente e os analistas treinados e qualificados (BRASIL, 2003).

2 RELEVÂNCIA

A Raiva é endêmica no Brasil e a ocorrência da doença em cães em regiões de fronteira, nesta década, tem resultado em uma média de 48 casos em cães/ano e cerca de dois casos humanos transmitidos por cão/ano. Além disso, a raiva está presente em todo território nacional em animais silvestres e em animais de produção (CALDAS, 2015).

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

Apesar do status de controle da doença, este aumento se deve a mudanças em fatores como o tipo de relação homem/cão e ao próprio crescimento das populações humana e canina, sendo estimado na década de 1970 que a proporção era de um cão para cada 10 humanos, como preconizado pela OMS (OMS, 1990), já em 2016 podemos estimar uma população canina de 53 milhões no Brasil, o que, em relação à população humana da época, representaria uma relação de um cão para aproximadamente quatro humanos, havendo pelo menos um cão em 44,3% dos lares brasileiros (BRASIL, 2015).

É de suma importância o controle da qualidade das vacinas distribuídas para a rede de saúde visando auxiliar a garantia da qualidade e eficácia dos protocolos de imunização. Um dos fatores para garantir a qualidade da vacina é a avaliação de sua potência pelo ensaio NIH (teste de proteção em camundongos). Assim sendo, é importante que o vírus desafio seja devidamente padronizado e possua um título conhecido e estável, atendendo os requisitos mínimos exigidos pela OMS e desta forma possa garantir a aceitação dos ensaios de NIH utilizados no controle da qualidade das vacinas antirrábicas.

3 OBJETIVO GERAL

Padronizar o título do lote de Vírus Trabalho VT15 que será utilizado como vírus desafio no ensaio de potência NIH para vacina antirrábica, seguindo as orientações da OMS.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar estudo para padronização do título do lote de vírus de desafio (VT15).
- Realizar o Controle Sistemático dos resultados do título do vírus utilizando gráficos de controle.
- Verificar o método de titulação do vírus rábico em camundongos.

4 METODOLOGIA

Os ensaios foram realizados seguindo orientações da OMS (WILBUR & AUBERT, 1996) descritos no Procedimento Operacional Padrão (POP) número 65.3430.015 (INCQS, 2013). O ensaio está inserido no protocolo da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) P172016-1 sendo previsto sua utilização na rotina laboratorial. Todos os ensaios seguiram os princípios éticos do uso de animais de experimentação, aplicando tratamento humanitário, evitando estresse excessivo, minimizando a dor e o desconforto durante os procedimentos (ANDERSEN et al., 2004). Os procedimentos foram realizados com equipamentos calibrados, por equipe devidamente treinada e imunizada contra raiva.

4.1 VÍRUS TRABALHO LOTE VT15

O lote VT15 foi produzido pela inoculação de 50 camundongos com 1000 DL50 de vírus rábico fixo semente da cepa CVS originário do *Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis* (INPPAZ, Argentina), órgão de referência da OMS/OPAS. Foram obtidos 79 criotubos com 0,5 mL de uma suspensão a 20% de cérebros de camundongos infectados, produzido em único processo, com composição uniforme e mantidos em freezer a $-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Foram utilizados no estudo 25 criotubos para a realização de 25 ensaios, em sete corridas independentes, que ocorreram em dias distintos.

4.2 BIOSSEGURANÇA

Todos os procedimentos foram realizados seguindo medidas adequadas de biossegurança. Utilizou-se Equipamentos de Proteção Individual (EPI) como jaleco, luvas e máscara. A área de trabalho foi limpa com álcool 70% e utilizou-se materiais

esterilizados e/ou descartáveis estéreis. O material utilizado foi descartado em solução viricida (hipoclorito de sódio a 1%) e os procedimentos de diluição do vírus foram realizados em cabine de segurança biológica classe II tipo B2.

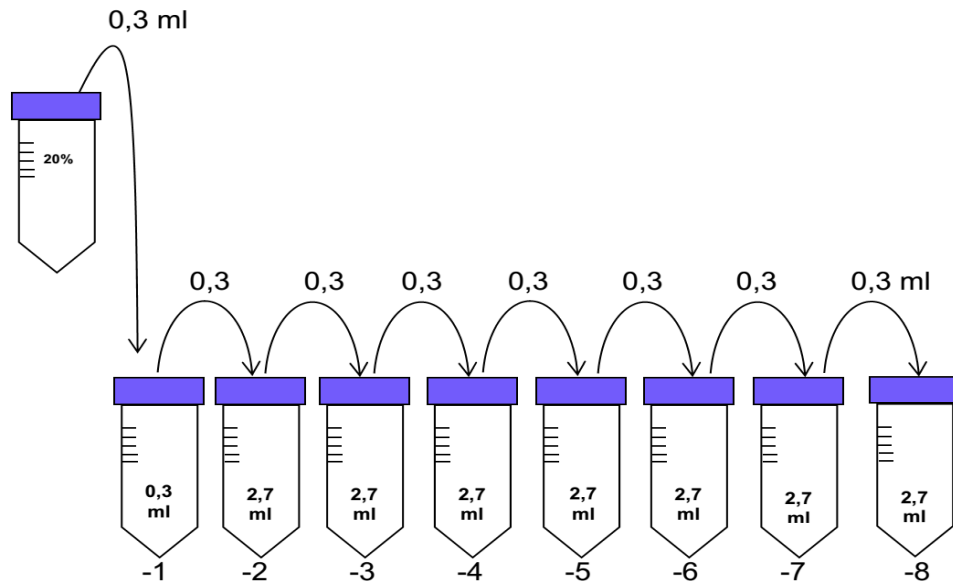
4.3 PREPARO DAS DILUIÇÕES

A solução de albumina a 0,75% foi utilizada como diluente para vírus, sofrendo adição de antibióticos (200 UI penicilina e 200 µg estreptomicina), com o objetivo de evitar infecções decorrentes da inoculação.

Os tubos foram identificados com as diluições 10^{-1} a 10^{-8} , sendo distribuídos 2,7 mL da solução albumina em cada um desses, a partir do tubo 10^{-2} , enquanto nos tubos 10^{-1} foram adicionados 0,3 mL do diluente. Os tubos foram mantidos em banho de gelo.

Os criotubos contendo o VT15 foram descongelados sob água corrente, com o auxílio do agitador de tubos, sendo cada tubo retirado do freezer e descongelado somente no momento de sua diluição. Foi adicionado 0,3 mL do vírus no tubo 10^{-1} que foi homogeneizado com pipeta e agitador por 5 segundos. Uma alíquota de 0,3 mL da diluição 10^{-1} foi transferida para o tubo seguinte que continha 2,7 ml de diluente. Realizou-se o mesmo procedimento de transferência de 0,3 ml até chegar a última diluição (10^{-8}) como demonstrado na Figura 5. As diluições de 10^{-1} a 10^{-4} foram descartadas nos ensaios 1, 2, 3 e 7, enquanto nos ensaios 4, 5 e 6 foram descartadas, também, a diluição 10^{-5} , pois verificou-se nos ensaios iniciais que, tal diluição, causava mortalidade de 100% dos animais, assim como na diluição seguinte.

Figura 5 – Esquema de diluição do vírus trabalho para ensaio de titulação.



Fonte: Adaptado POP INCQS 65.3430.015.

4.4 ANIMAIS

Para a titulação do VT 15, foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss Webster*, fêmeas e machos, de aproximadamente 3 semanas de vida e com peso variando entre 11 e 14 gramas. Os animais utilizados eram provenientes de colônia convencional *outbreed*, fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB, antigo Centro de Criação de Animais de Laboratório - CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, separados por sexo, no Serviço de Animais de Laboratório (SAL), com ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão, temperatura média de $23^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, umidade $50\% \pm 20\%$ e com água e ração a vontade (INCQS, 2015).

4.5 INOCULAÇÃO

A etapa de inoculação foi realizada no infectório de raiva, localizado no bloco 6 do INCQS. Os animais foram separados em grupos de 10 animais do mesmo sexo e alocados em uma mesma gaiola de acordo com a diluição que receberia.

Nos ensaios 1, 2, 3 e 7 inoculou-se pela via i.c., com o auxílio de uma seringa, 0,03 mL das diluições 10^{-5} a 10^{-8} , enquanto que nos ensaios 4, 5 e 6 as diluições inoculadas foram 10^{-6} a 10^{-8} . Cada diluição foi inoculada em um grupo de 10 animais, começando-se pela maior diluição (10^{-8}). Os animais foram colocados em gaiolas devidamente etiquetadas contendo informações como: número da gaiola, quantidade de animais e diluição inoculada, e foram reposicionadas na estante.

4.6 PERÍODO DE OBSEVAÇÃO

Os animais foram observados por 14 dias registrando-se os dados de evolução de sinais em protocolo padronizado. Foi registrado o número de mortes por raiva depois dos primeiros cinco dias. Mortes ocorridas antes do 5º dia não foram computadas, pois ocorrem devido a outras causas, como traumas durante a inoculação. Foram utilizados desfechos humanitários, sendo os animais submetidos à eutanásia assim que os sinais de raiva estivessem estabelecidos.

4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A relação de mortos/inoculados para cada diluição foi inserida no programa de análise estatística de ensaios biológicos CombiStats - versão 5.0 (*European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare – Council of Europe*), sendo obtido os resultados para o título do vírus testado, expresso em logaritmo da

DL50/0,03 mL via i.c. em camundongos, que foi calculado pela aplicação do modelo estatístico de análise de Probitos, utilizando o mesmo programa. Para o cálculo dos parâmetros de verificação (veracidade e precisão), os dados obtidos foram inseridos em planilha de Excel produzida e validada frente ao capítulo <1033> da *United States Pharmacopeia* (USP) para validação de bioensaios (USP, 2010).

4.8 DESENHO DO ESTUDO

4.8.1 Padronização do título do lote de vírus de desafio

Foram testadas 25 amostras do lote de vírus, sendo três amostras em cada um dos ensaios 1, 2 e 3 e quatro amostras em cada um dos ensaios 4, 5, 6 e 7. Cada amostra foi tratada como uma amostra independente, passando por todo o processo desde o descongelamento até a diluição e finalmente a inoculação.

Decorridos os 14 dias de observação dos animais, após a inoculação, foi obtido a relação mortos/inoculados que foi inserida no programa CombiStats. O programa foi utilizado para a obtenção dos valores dos títulos de cada amostra, para combinar os valores de títulos obtidos nos ensaios e assim obter as médias ponderada e a semi-ponderada como recomendado pela Farmacopeia Europeia (COUNCIL OF EUROPE, 2016) e para avaliar a homogeneidade dos resultados. O valor central determinado correspondeu ao título do lote de Vírus.

Não há uma regra restringindo qual dos modelos de combinação deve ser usado, mas a seguinte regra pode ser usada (EDQM, 2016):

- a) Se o valor de p para homogeneidade é maior que 0,1, os intervalos de confiança são suficientemente homogêneos para usar a combinação ponderada;
- b) Se o valor de p é menor que 0,1, o intervalo de confiança tende a ser heterogêneo e será melhor usar a combinação semi-ponderada.

4.8.2 Controle sistemático do lote – gráficos de controle

No presente trabalho os títulos obtidos foram inseridos no programa SPC Explorer RT, versão 5.21 (*Quality América Inc.*) para a elaboração de gráficos de controle e avaliação do comportamento do vírus ao longo dos ensaios (controle sistemático).

4.8.3 Verificação do ensaio de titulação viral em camundongos

Para a verificação do método de ensaio, foram avaliados os seguintes parâmetros:

Veracidade: é a estimativa do erro sistemático, foi expressa como a tendência (do inglês *Bias*) – que é a diferença entre o valor medido obtido a partir de múltiplas medições repetidas com a mesma amostra e o valor de referência - é a expressão quantitativa da veracidade. Para estimar a veracidade, o título obtido nos três primeiros ensaios foi considerado como o valor de referência e utilizado no cálculo da Tendência Relativa (TR). Adotamos empiricamente, o critério de aceitação recomendado para ensaios imunoenzimáticos para veracidade $\pm 20\%$ (EMA, 2011).

$$TR\% = \frac{\text{Título Médio Referência} - \text{Título Médio Experimental}}{\text{Título Médio Referência}} \times 100$$

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{Título Médio Experimental}}{\text{Título Médio Referência}} \times 100$$

Precisão: expressa a proximidade de concordância (grau de dispersão) entre uma série de medições obtidas a partir da avaliação múltipla da mesma amostra homogênea nas condições prescritas. A precisão pode ser considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (entre laboratórios).

No presente estudo foram avaliadas a repetibilidade e a precisão intermediária, que foram expressas como Coeficiente de Variação Percentual (CV%). Para o cálculo do CV%, os desvios padrões foram obtidos como a raiz quadrada de:

- a) variância da repetibilidade, calculada entre os resultados das diferentes amostras em cada ensaio;
- b) da variância entre-ensaios, calculada utilizando os resultados obtidos nas diferentes corridas de ensaios;
- c) da variância intermediária, pela soma das variâncias intra e entre-ensaios.

$$s^2 = \frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}$$

$$CV\% = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Título Médio}} \times 100$$

Adotamos empiricamente, o critério de aceitação recomendado para ensaios imunoenzimáticos para precisão $\leq 20\%$ (EMA, 2011). Também foi avaliada a variabilidade seguindo a recomendação do ICH para lotes de vírus utilizados em estudos com produtos biológico/biotecnológicos que considera homogêneo, o lote com uma variação máxima de 0,5 logaritmo (log) de desvio padrão, de teste para teste, no título do vírus (ICH, 1999).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho foi uma extensão da rotina de padronização de lotes de vírus efetuada no Laboratório de Vacinas Virais-Raiva quando um novo lote é produzido.

5.1 TITULAÇÃO DO VÍRUS

A variabilidade do título do vírus rábico é um ponto crítico para a realização do ensaio NIH no controle da qualidade das vacinas antirrábicas. Sendo assim, todo lote de CVS trabalho produzido deve ser submetido a um estudo de padronização de seu título, para que se verifique a viabilidade do lote (BRASIL, 2008).

A Tabela 1 apresenta os resultados de título de cada amostra de vírus (criotubo) testado, expresso em logaritmo da DL50 e os limites inferiores e superiores de confiança de 95%.

Tabela 1

Títulos virais expressos em logaritmo da DL50 por amostra testada.

Amostra / Ensaio	LIC	DL50	LSC
01 / 01	6,87	7,38	7,88
02 / 01	7,10	7,62	8,14
03 / 01	7,10	7,62	8,14
04 / 02	6,66	7,15	7,64
05 / 02	7,22	7,76	8,29
06 / 02	7,34	7,89	8,44
07 / 03	5,87	6,35	6,83
08 / 03	6,96	7,47	7,98
09 / 03	7,10	7,62	8,14
10 / 04	6,23	6,75	7,27
11 / 04	6,25	6,76	7,26
12 / 04	6,36	6,87	7,38
13 / 04	6,56	7,07	7,59
14 / 05	6,70	7,19	7,74
15 / 05	6,79	7,21	7,65
16 / 05	6,96	7,44	8,17
17 / 05	7,52	7,80	8,08
18 / 06	5,17	6,32	6,82
19 / 06	5,17	6,42	6,97
20 / 06	6,14	6,68	7,13
21 / 06	6,05	6,30	6,55
22 / 07	6,65	7,20	16,41
23 / 07	6,65	7,20	16,41
24 / 07	6,69	7,00	7,31
25 / 07	6,92	7,20	7,48

Legenda: LIC - Limite Inferior de Confiança de 95%; LSC - Limite Superior de Confiança de 95%

Fonte: Adaptado CombiStats - versão 5.0, 2016.

Os valores obtidos, para os títulos virais em logaritmo da DL50, variaram entre 6.30 e 7.89 ($10^{6,30}$ e $10^{7,89}$). Apesar das variações ocorridas nos valores dos títulos, os mesmos se mantiveram dentro do requerimento mínimo de 10^6 , estabelecido pela OMS.

Quando avaliada a diferença entre cada amostra, que não pode ser maior do que uma diluição decimal (WILBUR & AUBERT, 1996), houve apenas três (amostras 7, 8 e 18) onde esta diferença foi maior que uma diluição.

A Tabela 2 agrupa os valores dos títulos obtidos por amostra, a média de cada ensaio e a média geral dos ensaios. Os três primeiros, permitiram estimar a média do título inicial que foi tomado como valor de referência para os demais ensaios realizados, para assim realizar a verificação e selecionar as diluições que forneceriam

as 32 DL50 convencionalmente utilizadas no ensaio NIH (reflete o arredondamento do logaritmo da média do intervalo 10 a 50 DL50 = 30; $\log 30 = 1,47 \approx 1,5$).

Tabela 2

Títulos virais expressos em logaritmo da DL50 de cada amostra, dos sete ensaios realizados, médias dos títulos e média do título inicial baseado nos 3 primeiros ensaios.

Ensaio	Corridas				Média	Média Título Inicial / Referência
	n1	n2	n3	n4		
01	7,38	7,62	7,62	NR	7,54	7,43
02	7,15	7,76	7,89		7,60	
03	6,35	7,47	7,62		7,15	
04	6,75	6,76	6,87	7,07	6,86	
05	7,19	7,21	7,44	7,80	7,41	
06	6,32	6,42	6,68	6,30	6,43	
07	7,20	7,20	7,00	7,20	7,15	
Média Não Ponderada	p=0,000				7,13	
Média Ponderada					7,10	
Média Semi-Ponderada					7,12	

Legenda: NR - Não Realizado

Fonte: Elaborado pela autora com dados obtidos no CombiStats, 2016.

Uma vez que os intervalos de confiança dos ensaios foram considerados heterogêneos, com valor de p menor que 0,1, na análise efetuada pelo CombiStats para combinação dos dados, o título final (DL50) do lote de vírus VT15 foi estabelecido como a média semi-ponderada de 7,12 ($10^{7,12}$).

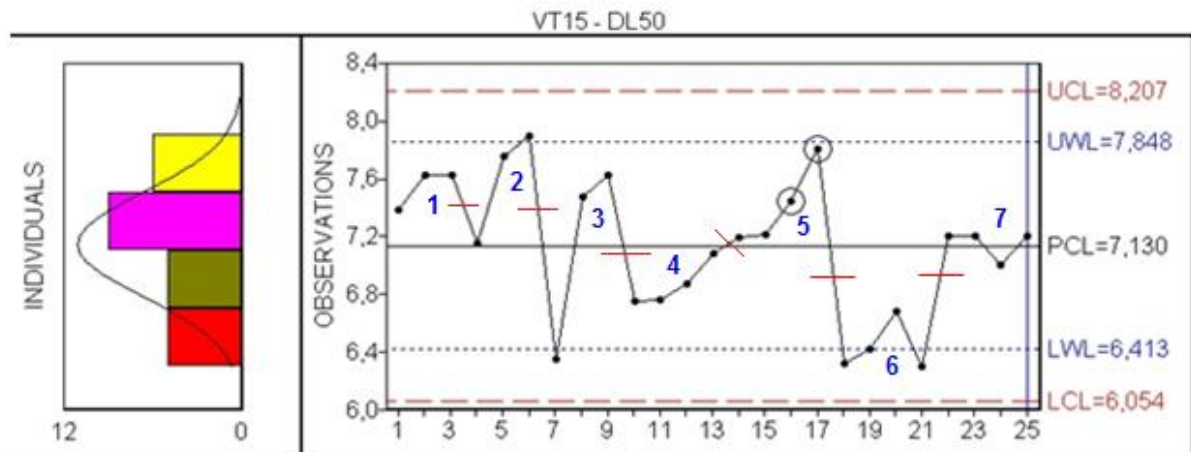
5.2 CONTROLE SISTEMÁTICO DO LOTE

Os valores dos 25 títulos obtidos foram lançados em gráficos de controle para realizar o controle sistemático do lote e estão representados por cada ponto do gráfico da Figura 6. Os ensaios 4 e 6, representados pelos pontos de 10 a 13 e de 18 a 21, respectivamente, apresentaram títulos mais baixos, o que pode indicar a ocorrência

de fontes de variação assinaláveis como a saúde dos animais, pH das soluções diluentes, entre outras.

Na figura 6, cada ensaio foi identificado por seu número de ordem e separado, por um traço vermelho, para uma melhor visualização do processo. Entre os ensaios 4 e 5 podemos notar uma tendência não aleatória transitória (com a presença de oito pontos consecutivos aumentando no gráfico), indicando que a média do processo se alterou, sendo necessário aumentar a supervisão do mesmo.

Figura 6. Gráfico de controle obtido pelo software SPC Explorer RT demonstrando o comportamento do vírus (tendência) com base em seu título.



Legenda: UCL – limite superior de controle, UWL – limite superior de alerta, LWL – limite inferior de alerta, LCL – limite inferior de controle.

Fonte: SPC Explorer RT, 2016.

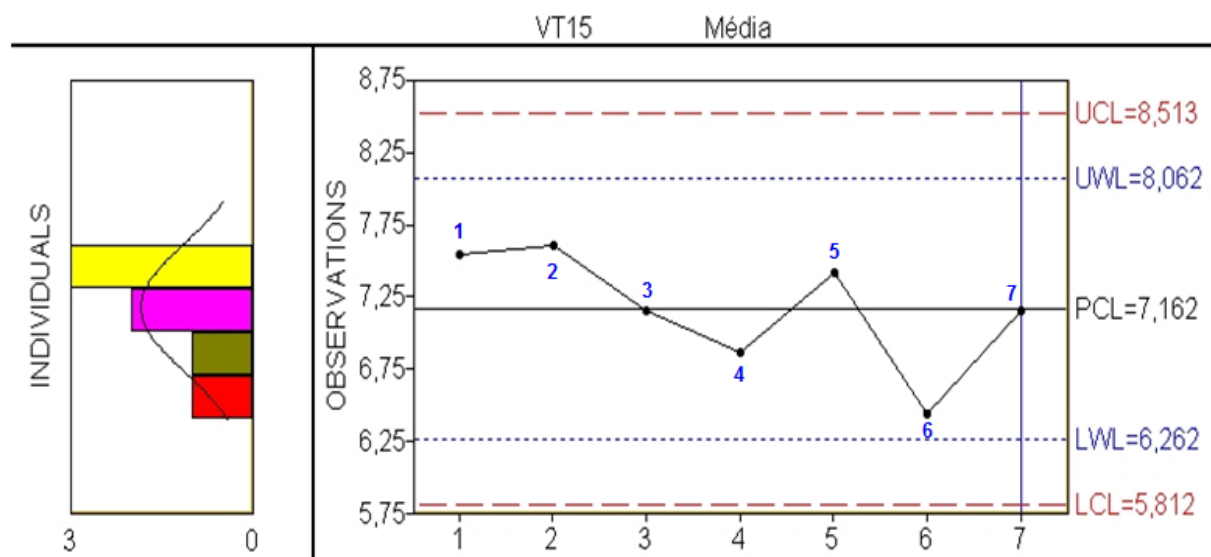
Esse gráfico permitiu o acompanhamento das variações nos títulos virais em cada amostra dos ensaios, avaliando se os mesmos encontravam-se dentro dos limites de controle. Observou-se que apesar da ocorrência de variações e tendências não aleatórias o vírus manteve-se dentro dos intervalos de 99% de controle.

Não foi possível identificar a causa dessas tendências, mas provavelmente, foram devidas ao desenho do estudo onde várias amostras foram testadas em um mesmo ensaio, sendo o tempo entre a realização da diluição de cada amostra e a inoculação, um fator que afetou os títulos. Fica evidente que a primeira amostra de cada ensaio apresenta título menor que a última. Tal perda deve ser decorrente da

espera em diluir as demais amostras e isto gerou tendências intra ensaios, tendo os resultados intra ensaios apresentado-se menos dispersos quando comparados aos demais, desta forma, apresentaram uma variação intra ensaios menor que a variação entre ensaios.

Quando lançadas as médias de cada um dos ensaios no gráfico de controle (Figura 7), é possível observar que o lote VT15 encontra-se sob controle, mostrando homocedasticidade. Entretanto tal gráfico deve ser alimentado com mais dados para que forneça uma maior significância estatística.

Figura 7. Gráfico de controle obtido pelo software SPC Explorer RT demonstrando o comportamento do vírus (tendência) com base na média dos títulos de cada um dos sete ensaios.

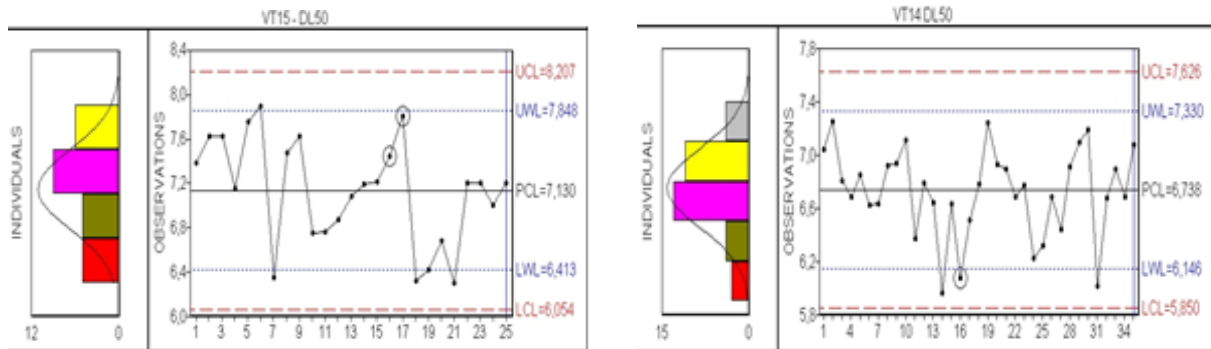


Legenda: UCL – limite superior de controle, UWL – limite superior de alerta, LWL – limite inferior de alerta, LCL – limite inferior de controle.

Fonte: SPC Explorer RT, 2016.

A Figura 8 apresenta os gráficos de controle dos lotes VT15 e VT14, seu antecessor. Os resultados do lote VT15 apresentam uma variabilidade maior, no entanto os resultados se referem somente a ensaios de titulação do vírus onde mais de uma amostra foram testadas e o do lote VT14 apresenta dados do ensaio NIH, em sua maioria, que tendem a ser mais homogêneos por ser utilizado apenas um frasco por ensaio.

Figura 8. Gráficos de controle obtidos pelo software SPC Explore RT comparando o comportamento (tendência) do VT15 e VT14 com base em seu título.



Legenda: UCL – limite superior de controle, UWL – limite superior de alerta, LWL – limite inferior de alerta, LCL – limite inferior de controle.

Fonte: SPC Explorer RT, 2016

5.3 VERIFICAÇÃO DO ENSAIO DE TITULAÇÃO VIRAL EM CAMUNDONGOS

Em geral ensaios compendiais são aceitos como validados não necessitando ser submetidos a processos de validação extensos (BRASIL, 2003), no entanto pode ser necessário realizar uma validação reduzida, neste caso, denominada verificação, para demonstrar que o método apresenta as características necessárias ao seu uso. Com a finalidade de exercitar tal procedimento, foi realizada uma verificação do ensaio de titulação do vírus rábico para os parâmetros veracidade e precisão, visando a demonstração de sua confiabilidade.

A veracidade de um método analítico é o grau de concordância entre a média de um grande número de resultados de um ensaio e o valor de referência. Para determinar a veracidade não precisamos saber o valor verdadeiro, mas precisamos saber um valor de referência, que nesse caso, foi obtido como a média dos resultados dos três primeiros ensaios. É expressa como a TR% que é a diferença entre o valor medido obtido a partir de múltiplas medições repetidas com a mesma amostra e o valor de referência (ISO, 2006).

A recuperação mede a tendência total do procedimento analítico e, portanto, é uma expressão de sua veracidade (BRASIL, 2011b). A Tabela 3 apresenta a verificação do método, segundo o parâmetro veracidade.

Tabela 3

Verificação - Parâmetro Veracidade.

Ensaio	Título Esperado	Título Obtido	% Tendência Relativa	Critério de Aceitação	% Recuperação
01	7,43	7,54	+ 1,48	±20%	101,48
02	7,43	7,60	+ 2,29		102,29
03	7,43	7,15	- 3,77		96,23
04	7,43	6,86	- 7,67		92,33
05	7,43	7,41	- 0,27		99,73
06	7,43	6,43	- 13,46		86,54
07	7,43	7,15	- 3,77		96,23
Média Geral	7,43	7,16	- 3,63		96,37

Fonte: A autora, 2016.

Todos os resultados obtidos para a TR% foram inferiores ao critério de aceitação de $\pm 20\%$ e os Recuperação % ficaram dentro dos 80% a 120%, como estabelecido como critério de aceitação, indicando que o ensaio de titulação viral em camundongos é capaz de determinar o título de suspensões de vírus rábico com veracidade conforme.

A precisão de um método pode ser avaliada pela dispersão dos resultados analíticos em relação à sua média. Define-se como sendo o grau de concordância entre os valores de uma série repetida de ensaios analíticos, que pode ser expressa como CV% (ISO, 2006). Pode ser avaliada pela repetibilidade (CV intra ensaios), CV entre ensaios e Precisão intermediária (EMA, 2011).

A Tabela 4 apresenta os resultados do parâmetro precisão realizado para a verificação do ensaio e mostram que os resultados apresentaram conformidade com o critério de aceitação adotado.

Tabela 4

Verificação – Parâmetro Precisão.

			Critério de Aceitação
Precisão	CV Intra ensaios	4,24%	≤20%
	CV Entre ensaios	5,77%	
	Precisão Intermediária	10,05%	
	Desvio Padrão Intra/Entre	0,30 / 0,41	≤0,5

Fonte: A autora, 2016.

Vale ressaltar que não existem critérios de aceitação estabelecidos para validações de ensaios/produtos biológicos, que apresentam alta variabilidade.

Entretanto, adotamos empiricamente, a variabilidade máxima recomendada para ensaios imunoenzimáticos para veracidade ($\pm 20\%$) e precisão ($\leq 20\%$) (EMA, 2011).

6 CONCLUSÃO

6.1 PADRONIZAÇÃO DO TÍTULO DO VT 15

O título do lote VT 15 de CVS para desafio no ensaio de potência para vacinas contra raiva manteve-se com no mínimo 10^6 DL₅₀ /0,03 mL i.c. em camundongos ao longo dos sete ensaios, sendo considerado conforme, atendendo ao requerimento mínimo preconizado pela OMS (WILBUR & AUBERT, 1996). O título foi padronizado como $10^{7,12}$.

6.2 CONTROLE SISTEMÁTICO DO LOTE VT15

Apesar das flutuações do título do vírus, ele se manteve nos limites esperados. O ensaio de titulação viral está sob controle (todos resultados dentro os limites de 99%), no entanto foi possível detectar uma tendência não aleatória transitória, não tendo sido possível identificar as causas, provavelmente sendo devidas ao desenho do estudo onde várias amostras foram testadas em um mesmo ensaio.

Ao comparar o comportamento do VT15 com seu antecessor, o VT14, ainda em uso, o lote apresentou maior variabilidade.

Há indícios de que o desenho experimental diferente do procedimento realizado no ensaio NIH e que isso tenha influenciado, pois houve homogeneidade maior intra grupos e marcadas micro tendências tempo-dependentes.

6.3 VERIFICAÇÃO DO ENSAIO

Não existem critérios de aceitação estabelecidos para validação de ensaios biológicos, entretanto os valores de variabilidade máxima se mantiveram abaixo dos 20% adotado empiricamente para o estudo. Os resultados foram precisos e com

veracidade conforme, de acordo com o preconizado pela OMS e são considerados homogêneos, ou seja, desvio padrão $< 0,5 \log$, como recomendado pela ISO (ISO,1999).

A variação obtida para o lote foi acima do esperado, no entanto, o desenho de estudo difere do padrão de utilização do vírus, por isto, será instrutivo realizar três ensaios NIH completos utilizando o lote VT15 para o desafio como estudo suplementar ao estabelecimento do vírus.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA EUROPEIA DE MEDICINA - EMA. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). EMA/CHMP/EWP/192217/2009. Rev.1 Corr. Guideline on bioanalytical method validation. 2011.

ANDERSEN, M. L. et al. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo, 2004.

BATSON, H. C.; BROWN, M.; OBERSTEIN, M. An adaptation of quality control chart methods to bacterial vaccine potency testing. **J Bacteriol.** v.61, n.4, p. 407–419, 1951.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: ANVISA, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em:< http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf>. Acesso em: 06 jan. 2017.

_____. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Departamento de Vigilância Epidemiologia. **Manual de diagnóstico Laboratorial da raiva**. 1. ed. Brasília: Ministério da saúde, 2008. 108 p.

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

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: MAPA. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Brasília: Mapa, 2011b. 72 p.

_____. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: IBGE. **Pesquisa nacional de saúde: 2013: acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violências: Brasil, grandes regiões e unidades da federação**. Rio de Janeiro: IBGE, 2015. 100p.

_____. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância Sanitária. Portal da Saúde. **Situação Epidemiológica – Dados**. 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/752-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/raiva/11431-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: 20 nov. 16.

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**, Geneva, v. 45, n.3, p. 303–315, 1971.

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

CALDAS, E.P. Situação da Raiva no Brasil. In: **Seminário do Dia Mundial contra a Raiva**, VIII, São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://saude.sp.gov.br/resources/instituto-pasteur/pdf/wrd2015/situacaodaraivanobrasil-eduardopachecodecaldas.pdf>>. Acesso em: 11 out. 2016.

COUNCIL OF EUROPE. Combination of assay results. chp 5.3 - Statistical analysis. In: **The European Pharmacopoeia, (2008)**, 6. ed. Strasbourg, 2016. p. 628-630.

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

EDQM – Council of Europe. CombiStats v5.0, www.combistats.eu. 2016.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. 2 v.

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

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. POP 65.3430.015: Produção e Controle da Qualidade de Vírus Rábico Fixo Semente e de Trabalho. Rev. 4. Rio de Janeiro, 2013. 16 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

_____. POP 65.3340.002: Boas Práticas em Experimentação Animal. Rev. 12. Rio de Janeiro, 2015. 16 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO PASTEUR DE SÃO PAULO, 2016. Site da Instituição. Disponível em: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/historia_01.htm>. Acesso em 15 out. 2016.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use. Harmonised Tripartite Guideline - Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin Q5A(R1). Geneva, 1999.

_____. Q2 (R1): Validation of analytical procedures: text and methodology, Geneva, 2005.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 7870-2. Control charts – Shewhart control charts. Part. 2. Geneva, 2013.

_____. ISO 3534-2. Statistics - Vocabulary and symbols. Part 2: Applied statistics. 2. ed. Geneva, 2006.

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

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

NETTO, E. J. R. et al. Controle da qualidade de vacinas contra febre amarela utilizadas no Programa Nacional de Imunizações do Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.70, n.4, p. 606-61, 2011. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S007398552011000400024&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 29 jun. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE: OMS. Guidelines for dog population management. Geneva; 1990.

_____. WHO Expert Committee on Rabies. Technical Report Series, n. 824. Geneva: WHO, 1992.

_____. Global Programme for Vaccines and Immunization, Vaccine Supply and Quality. A WHO Good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: validation. Geneva: WHO, 1997. p. 100. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/64465/2/WHO_VSQ_97.02.pdf>. Acesso em: 25 dez. 2016.

_____. WHO Technical Report Series. Annex 4 - Supplementary guidelines on good manufacturing practices: validation. Geneva: WHO, 2006. n. 937. p. 107 – 178. Disponível em: <http://apps.who.int/prequal/info_general/documents/TRS937/WHO_TRS_937-Annex4.pdf>. Acesso em: 25 dez. 2016.

_____. Rabies. Excerpt from "WHO recommended standards and strategies for surveillance, prevention and control of communicable diseases". Geneva: WHO, 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/rabies/epidemiology/Rabiessurveillance.pdf>>. Acesso em: 09 dez. 2016.

_____. Presence of dog-transmitted human rabies based on most recent data points from different sources, 2010-2014. Geneva. 2014. Disponível em: <http://www.who.int/rabies/Presence_dog_transmitted_human_Rabies_2014.png?ua=1>. Acesso em: dez 2016.

_____. Programmes – Rabies – Epidemiology and burden disease. Geneva: WHO, 2016a. Disponível em: <<http://www.who.int/rabies/epidemiology/en/>>. Acesso em: 05. mai. 2016.

_____. Weekly epidemiological record. Geneva: WHO, 2016b. 91 anais. n. 43 p. 501 – 516. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250643/1/WER9143.pdf?ua=1>>. Acesso em: 27 dez. 2016.

_____. Rabies. Whats is rabies?. Geneva: WHO, 2016c. Disponível em: <<http://www.who.int/rabies/about/en/>>. Acesso em: 05. mai. 2016.

_____. Rabies, Relevant Documents and Publications, Guidelines, General information on rabies surveillance and exposure treatment. Geneva: WHO, 2016d. Disponível em: <<http://www.who.int/rabies/epidemiology/Rabiessurveillance.pdf?ua=1>>. Acesso em: 12 out. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL: OIE. **Rabies Portal**. 2016. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/rabies-portal/>>. Acesso em: 05 mai. 16.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE: OPAS. Epidemiological Information System. Histories. Exportation. 2016. Disponível em: <<http://siepi.panaftosa.org.br/Export.aspx>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

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

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

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

UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP. Biological Assay Validation. EUA, 2010. chp.1033.

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

WILBUR, L. A; AUBERT, M. F. A. The NIH Test for potency. In: Meslin, F. X.; Kaplan, M. M.; Koprowski. **Laboratory Techniques in Rabies**. Geneva: WHO, 1996. p. 360-364.