

**ESTUDO INTERLABORATORIAL PARA O ESTABELECIMENTO DO  
VENENO BOTRÓPICO E DO SORO ANTIBOTRÓPICO DE REFERÊNCIA  
NACIONAL**

**ELIZABETH PORTO REIS LUCAS**

Mestrado Profissional

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Orientador: Dr. Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida

Rio de Janeiro

2009

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Estudo interlaboratorial para o estabelecimento do veneno botrópico e do soro antibotrópico de referência nacional

Elizabeth Porto Reis Lucas

Dissertação 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 Mestre.

Aprovado:

Prof. \_\_\_\_\_ (INCQS/FIOCRUZ)

Dr<sup>a</sup>. Helena Pereira Zamith

Prof. \_\_\_\_\_ (UFF)

Dr. André Lopes Fuly

Prof. \_\_\_\_\_ (INCQS/FIOCRUZ)

Dr. Humberto Pinheiro de Araújo

Orientador: \_\_\_\_\_ (INCQS)

Dr. Antônio Eugênio Castro Cardoso de Almeida

Rio de Janeiro

2009

## FICHA CATALOGRÁFICA

Lucas, Elizabeth Porto Reis

Estudo interlaboratorial para o estabelecimento do veneno botrópico e do soro antibotrópico de referência nacional / Elizabeth Porto Reis Lucas. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009.

xiii, 91 p., il., graf., quad.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2009. Orientador: Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida.

1. Soro antibotrópico 2. Veneno botrópico 3. Estudo interlaboratorial. I. Título

*Dedico este trabalho in memoriam de meus pais, a quem devo pela vida, pelo exemplo, pelo esforço e por sempre terem me apoiado e acreditado nos meus objetivos e incentivado nesta trajetória do meu trabalho.*

*Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é  
alguém que acredite que ele possa ser realizado.*

Roberto Shinyashiki

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me concebida mais esta realização.

Ao meu marido José Augusto e aos meus filhos Diogo, Fabio e Rafaela pela força, ajuda e compreensão da ausência de mulher e mãe durante a realização deste trabalho.

Ao INCQS pelo suporte dado à realização deste estudo.

A Coordenação de Pós-Graduação pela oportunidade de desenvolvimento pessoal e profissional oferecida.

A Dra. Isabella Fernandes Delgado, pelo apoio para frequentar o curso de mestrado.

Ao Dr. Antônio Eugênio Castro Cardoso de Almeida, meu orientador pelo seu espírito inovador, pelo seu conhecimento, pela sua paciência e incentivo que me proporcionou durante este trabalho.

A Dr<sup>a</sup> Helena Pereira Zamith, por ter me ajudado na revisão deste trabalho com sua sabedoria, dedicação e presteza.

Ao colega Humberto Pinheiro de Araújo pela participação no trabalho e por ter aceitado fazer parte da banca.

A colega Maria Aparecida Affonso Boller pela paciência, atenção, participação no trabalho e também no auxílio da formatação do mesmo.

Aos colegas do Departamento de Imunologia pelo carinho e força recebidos, principalmente a minha comadre Ivani Cútis dos Santos e Wlamir Correa de Moura pela ajuda na parte estatística do presente trabalho.

Ao Dr. André Lopes Fuly por ter aceitado fazer parte da minha banca.

A Dr<sup>a</sup> Ana Cristina Nogueira pela força e incentivo.

Aos meus familiares: irmã, sobrinho, tias e sogros pela atenção a mim dedicada.

## RESUMO

A segurança e a eficácia da imunoterapia anti-venenamento ofídico estão intimamente relacionadas à pureza e a uma cuidadosa determinação da potência do soro (atividade biológica). A metodologia atualmente utilizada apresenta importantes limitações, as quais este trabalho objetiva contribuir. A mesma é adotada como oficial pela Farmacopéia Brasileira, tendo sido preconizada em 1996 pela Portaria nº 174/MS. Observações preliminares deste estudo identificaram, principalmente, um alto índice de invalidação de ensaios e uma baixa repetibilidade e reprodutibilidade, representado por diferenças significativas no ensaio de potência nos resultados obtidos pelo INCQS e pelos laboratórios produtores, enfatizando a necessidade de aperfeiçoar a metodologia analítica para a determinação da potência do soro antivenenotrópico. De acordo com as recomendações do “Workshop on the Standardization and Control of Antivenoms”, coordenado pela “Quality Assurance and Safety of Biologicals Unit” da OMS em 2001, o estabelecimento de venenos e antivenenos de referência é essencial para a padronização destes ensaios e para permitir a comparação lote a lote, assim como a comparação entre laboratórios.

Neste trabalho, apresentamos os resultados de um estudo interlaboratorial para o estabelecimento de veneno e antiveneno botrópico de referência, visando o aperfeiçoamento do controle da qualidade dos soros antivenenotrópicos, com ênfase na metodologia analítica para a determinação da potência, com a participação de todos os laboratórios brasileiros produtores de soro antivenenotrópico. Este estudo foi realizado em duas etapas. A primeira compreendeu a reavaliação da potência do lote nº 05 do Veneno Botrópico de Referência BRA/BOT/05, a avaliação da potência do candidato a Soro Antivenenotrópico de Referência Nacional BRA/ANTIBOT/01, e a avaliação da aplicabilidade de um controle da dose desafio de veneno referente a cinco vezes o valor de dose letal média ( $5 DL_{50}$ ). A segunda etapa compreenderá a comparação da metodologia de determinação da potência do Soro Antivenenotrópico pela determinação da Dose Efetiva Média –  $DE_{50}$  (Potência Absoluta) com a metodologia da Potência Relativa frente ao Soro Antivenenotrópico de Referência, através da determinação da potência de amostras codificadas. Esta monografia, entretanto irá tratar apenas do estabelecimento do veneno e antiveneno de referência.

Os resultados obtidos permitiram a avaliação das precisões intraensaios, interensaios e interlaboratorial, a frequência de ensaios inválidos assim como as diferentes interpretações dos laboratórios, INCQS e produtores nacionais à monografia do Soro Antivenenotrópico da Farmacopéia Brasileira.

## ABSTRACT

Safety and efficacy of antivenom immunotherapy are closely related with purity and an accurate potency determination (biological activity) of the antivenom. The murine lethality assay, still in use, present several limitations and is not a fully validated methodology. Preliminary data shows a high incidence of invalid assays and a low repeatability and reproducibility of potency assays, evidenced by significant differences between INCQS and manufacturers, indicating the need for improvement of the analytical methodology. According to the recommendations of the “Workshop on the Standardization and Control of Antivenoms”, sponsored by the Quality Assurance and Safety of Biologicals Unit of WHO at 2001, the establishment of local venom reference preparations and standard antivenom preparations are essential to standardize these assays and to allow batch to batch comparisons as well as comparisons between different laboratories.

In this work, we present the results of an interlaboratorial study - with the participation of all Brazilian manufacturers - for the establishment of the lot 05 of the Brazilian Bothropic Reference Venom and lot 01 of the Brazilian Reference Antivenom, looking forward the improvement of quality control of *Bothrops* antivenom.

This study was done in two steps. The first one consisted in the potency evaluation of the lot 05 of the Brazilian Bothropic Reference Venom, the potency evaluation of the lot 01 of the Brazilian Bothropic Reference Antivenom and the evaluation of the use of a control of the challenge dose of five times the median lethal dose (5 LD<sub>50</sub>). The second step consisted on the comparison between the absolute and the relative (parallel line assay) potency evaluation of commercial *Bothrops* antivenom, using the Brazilian Bothropic Reference Antivenom, in a blind assay. This monograph will focus only in the establishment of Brazilian Reference Bothropic Venom and Antivenom.

These results allowed us to evaluate the intra-assay; inter-assay and inter-laboratorial precision, the incidence of invalid assays, and showed that each laboratory interpret differently the *Bothrops* Antivenom monograph of Brazilian Pharmacopoeia.



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BRA/ANTIBOT/01	Soro Antibotrópico de Referência Nacional – lote 01
BRA/BOT/05	Veneno Botrópico de Referência Nacional – lote 05
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CENEPI	Centro Nacional de Epidemiologia
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CGPNI	Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações
CPPI	Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos
CV	Coeficiente de Variação
DE <sub>50</sub>	Dose Efetiva Média
DL <sub>50</sub>	Dose Letal Média
DP	Desvio Padrão
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
GTPB	Grupo Técnico de Produtos Biológicos
NR	Não realizado
IB	Instituto Butantan
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INV	Inválido
IP	Intraperitoneal
IVB	Instituto Vital Brazil
POP	Procedimento Operacional Padrão
SAL	Serviço de Animais de Laboratório
SES-RJ	Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro
SGA	Sistema Gerenciador de Amostra
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
WHO	World Health Organization

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Casos e óbitos registrados em acidentes por animais peçonhentos /serpentes por região do Brasil no ano de 2007	06
Quadro 2	Casos de intoxicação humana em 2007 - Sinitox	06
Quadro 3	Acidentes por animais peçonhentos/serpentes no Brasil (1999 – 2007)	07
Quadro 4	Serpentes do gênero <i>Bothrops</i> de importância médica no Brasil	10
Quadro 5	Acidente botrópico: Classificação quanto à gravidade e quantidade aproximada de veneno a ser neutralizada	17
Quadro 6	Número de ampolas de soro para tratamento de acidentes ofídicos	18
Quadro 7	Fases do processo de produção e controle de soros	20
Quadro 8	Relação dos lotes do “pool” candidato a Soro Antibotrópico de Referência	26
Quadro 9	Determinação das doses efetivas médias (DE <sub>50</sub> ) do Soro Antibotrópico candidato à Referência - combinação de 8 ensaios	28
Quadro 10	DE <sub>50</sub> do Soro Antibotrópico de Referência - BRA/ANTIBOT/01	29
Quadro 11	Protocolo de diluição para determinação da DL <sub>50</sub>	30
Quadro 12	Protocolo de diluição para o ensaio de soroneutralização (DE <sub>50</sub> )	31
Quadro 13	Determinação da DL <sub>50</sub> do Veneno Botrópico de Referência BRA/BOT/05, realizada pelo INCQS e pelos laboratórios produtores	43
Quadro 14	Determinação do valor médio da DL <sub>50</sub> do Veneno Botrópico de Referência BRA/BOT/05 (INCQS)	44
Quadro 15	Determinação da DL <sub>50</sub> do Veneno Botrópico de Referência - combinação de 10 ensaios	45
Quadro 16	Determinação da potência do Soro Antibotrópico de Referência BRA/ANTIBOT/01 realizada pelo INCQS e pelos produtores	65
Quadro 17	Média dos resultados da potência do Soro Antibotrópico candidato à Referência Nacional BRA/ANTIBOT/01	66
Quadro 18	Precisão do ensaio da potência do Soro Antibotrópico de Referência	66
Quadro 19	Determinação das doses efetivas médias (DE <sub>50</sub> ) do Soro Antibotrópico de Referência - combinação de 15 ensaios	67

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Casos de intoxicação humana em 2007 - SINITOX	07
Gráfico 2	Acidentes por animais peçonhentos/serpentes no Brasil (1999- 2007)	08
Gráfico 3	Determinação das doses efetivas médias (DE <sub>50</sub> ) do Soro Antibotrópico candidato à Referência - combinação de 8 ensaios	28
Gráfico 4	Determinação da DL <sub>50</sub> do Veneno Botrópico de Referência - combinação de 10 ensaios	45
Gráfico 5	Determinação das doses efetivas médias (DE <sub>50</sub> ) do Soro Antibotrópico de Referência - combinação de 15 ensaios	67

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Bothrops alternatus</i>	10
Figura 2	<i>Bothrops atrox</i>	11
Figura 3	<i>Bothrops erytromelas</i>	11
Figura 4	<i>Bothrops jararaca</i>	11
Figura 5	<i>Bothrops jararacussu</i>	12
Figura 6	<i>Bothrops moojeni</i>	12
Figura 7	<i>Bothrops neuwiedi</i>	12
Figura 8	Processamento do plasma para obtenção de soro	19
Figura 9	Perfil eletroforético do Veneno Botrópico de Referência lote 05 – BRA/BOT/05.	24

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	01
1.1	Histórico	01
1.2	Epidemiologia	04
1.2.1	<i>Distribuição geográfica</i>	09
1.3	Mecanismo de ação do veneno	13
1.3.1	<i>Atividade inflamatória aguda</i>	13
1.3.2	<i>Atividade de coagulação</i>	14
1.3.3	<i>Atividade hemorrágica</i>	14
1.4	Acidente botrópico	14
1.4.1	<i>Gravidade do acidente</i>	15
1.5	Soroterapia	16
1.6	Produção de soros antipeçonhentos no Brasil	18
1.6.1	<i>Etapas da Produção</i>	18
1.7	Controle de qualidade de soros antipeçonhentos	20
1.7.1	<i>Testes de controle da qualidade do produto final</i>	21
1.8	Relevância do estudo	21
1.8.1	<i>A inserção do INCQS neste estudo</i>	22
1.9	Estudo colaborativo	22
<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	23
2.1	Objetivo geral	23
2.2	Objetivos específicos	23
<b>3</b>	<b>Material e Métodos</b>	24
3.1	Material	24
3.1.1	<i>Veneno Botrópico de Referência (BRA/BOT/05)</i>	24
3.1.2	<i>Soro Antibotrópico de Referência (BRA/ANTIBOT/01)</i>	25
3.1.3	<i>Animais utilizados</i>	25
3.2	Métodos	27
3.2.1	<i>Soroneutralização</i>	27
3.2.2	<i>Obtenção do “pool” de soro antibotrópico e determinação da potência do soro candidato à referência</i>	27
3.2.3	<i>Determinação da Dose Letal Média (DL<sub>50</sub>) do veneno de referência</i>	29
3.2.3.1	<i>Critérios para aceitação do ensaio</i>	30
3.2.4	<i>Determinação da potência do soro antibotrópico</i>	30
3.2.4.1	<i>Critérios de validação do ensaio</i>	31
3.2.4.2	<i>Valores Aberrantes</i>	32
3.2.5	<i>Protocolo do Estudo Colaborativo utilizado (conforme enviado aos produtores)</i>	32
3.2.5.1	<i>Material</i>	33
3.2.6	<i>Coleta e análise dos dados</i>	33
3.2.6.1	<i>Critérios de aceitação</i>	34
<b>4</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	35
4.1	Resultados	35
4.2	Discussão	68
<b>5</b>	<b>Conclusão</b>	71
<b>6</b>	<b>Referências</b>	72
<b>7</b>	<b>Anexo I</b>	76

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 HISTÓRICO

Desde a antiguidade o homem sempre sofreu envenenamentos causados por picadas de animais peçonhentos, que são aqueles que produzem substâncias tóxicas e apresentam aparelho especializado para inoculação do veneno, através de glândulas que se comunicam com dentes ociosos, ferrões, ou agulhões, por onde o veneno passa ativamente (INSTITUTO BUTANTAN, 2006).

João Batista Lacerda foi um dos pioneiros no estudo do ofidismo na América Latina. Ingressou na década de 1870, no Museu Nacional do Rio de Janeiro - RJ, onde produziu extensa obra, fundando o primeiro laboratório de fisiologia em nosso país. Realizou trabalhos sobre toxicologia dos venenos e sistemática ofídica, identificando novas espécies na fauna brasileira, como *B. jararacussu* e *B. urutu* (DIAS, 1966).

Sewall em 1887 demonstrou em pombos que a inoculação repetida, com doses altamente diluídas de venenos de *Sistrurus* (um tipo de cascavel norte-americana), induzia um estado de resistência contra os efeitos da peçonha, sem aparente influência sobre o estado de saúde dos animais.

Em 1890, Emil Behring trabalhando com toxina diftérica em Berlim e Shibasaburo Kitasato em Tóquio, trabalhando com toxina tetânica, relataram que coelhos e camundongos poderiam ser imunizados contra difteria e tétano. Eles também afirmaram que usando o soro imune podiam curar animais infectados, assim como prevenir animais saudáveis inoculados com as respectivas toxinas (WEN, 2003).

Em 1894, Albert Calmette após várias tentativas infrutíferas, conseguiu imunizar coelhos contra o veneno de cobra (*Naja*) após sucessivas inoculações subcutâneas com doses crescentes de veneno misturado com doses decrescentes de uma solução de hipoclorito de cálcio ou de sódio. Após oito meses alguns dos coelhos eram capazes de sobreviver a doses de 30 a 35 mg de veneno/animal. Além disso, o soro dos animais imunizados era capaz de neutralizar a atividade tóxica do veneno *in vitro*, assim como tinha efeito preventivo e terapêutico contra a intoxicação *in vivo*. Ao inocular coelhos com o dobro da dose letal (o que mata um coelho em aproximadamente 3 horas) e aplicar o soro imune por via intraperitoneal ou subcutânea após o aparecimento dos sintomas (regurgitações, taquicardia, dispnéia, parestesia dos membros), os animais permaneceram gravemente envenenados por um período de tempo relativamente longo, porém gradualmente retornaram ao normal (HAWGOOD, 1999).

Em 1901, o Doutor Vital Brazil, médico sanitário, consciente do grande número de acidentes com serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo, passou a realizar experimentos com os venenos ofídicos. Baseando-se nos primeiros trabalhos com soroterapia realizada pelo francês Albert Calmette em 1894, desenvolveu estudos sobre soros contra o veneno de serpentes, descobrindo sua especificidade, ou seja, cada tipo de veneno ofídico requer um soro específico, preparado com o veneno do mesmo gênero de serpente que causou o acidente (INSTITUTO BUTANTAN, 2006).

Entre as décadas de 1950 e 1980, as informações disponíveis sobre ofidismo eram provenientes de estudos pontuais, realizados principalmente na região Sudeste, com publicações em São Paulo e escorpionismo em Minas Gerais. (CARDOSO, 2003).

Em 1983, a indústria farmacêutica privada Syntex do Brasil, diferentemente da intenção manifestada à opinião pública e às autoridades sanitárias resolveu desativar a área de produção de imunobiológicos no país. Em consequência, a produção de antivenenos entrou em crise, ficando o atendimento restrito aos três laboratórios oficiais: Instituto Butantan - IB (SP), Instituto Vital Brazil - IVB (RJ) e Fundação Ezequiel Dias - FUNED (MG), que não apresentavam naquele momento, condições técnico-operacionais para atender à demanda nacional de soros anti-peçonhentos. A falta destes produtos deu origem a uma situação gravíssima, evidenciada no início de 1985, quando o produto efetivamente desapareceu dos serviços de saúde do país e a imprensa começou a acompanhar o quadro, relatando, para espanto da população, a amputação de pernas e braços de trabalhadores rurais e a ocorrência de óbitos decorrentes da inexistência de soros nos hospitais e postos de saúde procurados pelas vítimas de acidentes com animais peçonhentos (FRANÇA, 2003). Em 1986 foi criado o Programa de Autossuficiência Nacional em Imunobiológicos, pelo Ministério da Saúde que para atender à demanda nacional deste produto e dos outros imunobiológicos, utilizados no país, objetivando-se diminuir gradativamente, a necessidade de importação, sendo relevante a participação dos laboratórios oficiais (CARDOSO, 2003).

Os soros antiofídicos são disponibilizados gratuitamente à população através do Sistema Único de Saúde – SUS, não sendo comercializados nem disponíveis na rede de hospitais privados.

Os soros antibotrópicos atualmente utilizados no Brasil são produzidos pelo Instituto Butantan – IB (SP), Instituto Vital Brasil – IVB (RJ), Fundação Ezequiel Dias – FUNED (MG), através da imunização de cavalos com venenos provenientes das cinco espécies do gênero *Bothrops* mais prevalentes no Brasil: *B. jararaca* – 50%, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. jararacussu* e *B. neuwiedi* – 12,5% cada (Secretaria de Vigilância Sanitária

– Ministério da Saúde, 1996), e são distribuídos pelo Ministério da Saúde, através da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA).

Os métodos de dosagem da potência do soro eram realizados sem qualquer padronização. Somente avaliando a atividade do veneno sobre o sistema de coagulação sanguínea (SILES VILLARROEL, 1979). A avaliação da potência do soro era realizada com a incubação da mistura soro-veneno a 37 °C, durante 30 minutos e inoculação por via endovenosa em pombos. O período de observação de 20 a 30 minutos, não possibilitava a quantificação da atividade dos diversos anticorpos antitóxicos. Como o número de resposta para cada nível de diluição era pequeno, a análise estatística ficava prejudicada, influenciando assim a precisão das estimativas de potência. Após diversas avaliações experimentais foi padronizada a metodologia de titulação da potência do soro antibotrópico, através da inoculação de camundongos pela via intraperitoneal (DALMORA, 1992). Apesar de ser a metodologia oficial vigente, preconizada pela 4ª Edição da Farmacopéia Brasileira - parte II – 2004, não foi formalmente validada.

Mesmo com este longo caminho ressalta-se a necessidade de aperfeiçoar a metodologia analítica para a determinação da potência do soro antibotrópico, estabelecendo um antiveneno de referência essencial para a padronização dos ensaios de modo a permitir a comparação lote a lote, assim como a comparação entre laboratórios, conforme as recomendações da Organização Mundial de Saúde – OMS (THEAKSTON, 2003).

Como demonstrado, a pesquisa de métodos ideais para o doseamento dos antivenenos ofídicos tem sido uma constante desde o advento da soroterapia antiofídica. Em 1954, Schöttler já afirmou que “por mais laboriosa e custosa que esta tarefa possa parecer, ela deveria ser atacada com o objetivo de transformar o atual mistério que cerca a titulação dos soros antipeçonhentos em método prático, acessível e cientificamente fundado”. Theakston e colaboradores, em 2003 chamam atenção, que os testes de rotina utilizados para liberação de lotes de soros antipeçonhentos devem ser novamente estabelecidos e padronizados utilizando ensaios validados. Deste modo nosso projeto está buscando a metodologia mais sensível para o grave problema da proteção dos acidentes antiofídicos no Brasil.

Por isso o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS achou necessário realizar uma reunião de trabalho (maio – 2002), intitulada: *Situação atual perspectivas para a produção e controle de soros antipeçonhentos utilizados no Brasil*. Dentre os diversos temas abordados, podemos destacar a discussão sobre o aperfeiçoamento do controle da qualidade dos soros antiofídicos, com ênfase na



metodologia analítica para a determinação da potência. Este encontro contou com a participação de todas as entidades relacionadas com a produção, controle e distribuição dos soros antipeçonhentos no Brasil, que foram:

- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA
- Fundação Nacional de Saúde – FUNASA
- Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos – CPPI
- Fundação Ezequiel Dias – FUNED
- Indústria Química do Estado de Goiás – IQUEGO
- Instituto de Biologia do Exército – IBEx
- Instituto Butantan – IB
- Instituto Vital Brazil – IVB

Dentre as várias deliberações resultantes desta reunião, podemos destacar a disposição de todos os participantes em trabalhar conjuntamente na avaliação e implementação de melhorias nas metodologias analíticas para o controle da qualidade dos soros antipeçonhentos assim como a necessidade de se produzir novos lotes de venenos de referência botrópico e crotálico, e que o título destes venenos fossem estabelecidos através de um estudo colaborativo interlaboratorial. Foi ponto consensual que o desenvolvimento e validação de uma metodologia de avaliação da “potência relativa” dos soros antibotrópico e anticrotálico frente a um soro padrão de referência nacional, possivelmente seria a estratégia mais adequada no sentido de se obter resultados mais confiáveis e precisos, em curto ou médio prazo. Isto reforçou ainda mais nosso interesse em desenvolver este estudo que agora apresentamos.

## **1.2 EPIDEMIOLOGIA**

Mundialmente, existem aproximadamente 3.000 espécies de serpentes, sendo cerca de 600 venenosas. Estas serpentes são mais frequentemente encontradas nas regiões tropical e equatorial, mas podem ser encontradas em todas as regiões do planeta com exceção da Antártida (WHO, 2007). No Brasil foram descritas 326 espécies de serpentes, sendo 49 peçonhentas, 22 espécies da família *Elapidae* e 27 espécies da família *Viperidae* (SBH, 2005).

Apesar do grande número de espécies venenosas e da ampla distribuição geográfica destas serpentes, tanto a incidência global dos envenenamentos ofídicos quanto a sua

severidade permanecem muito pouco conhecidas, com exceção de poucos países onde estes acidentes são corretamente notificados. Desde os estudos realizados por Swaroop & Grab em 1954, nenhum levantamento global sobre a epidemiologia dos envenenamentos ofídicos foi realizado.

No Brasil os acidentes ofídicos são um importante agravo à saúde desde o período pré-colonial. Em 1560, José de Anchieta fez o primeiro registro sobre serpentes peçonhentas no Brasil com interessantes observações clínico-epidemiológicas, na célebre e sempre citada carta de São Vicente:

“[...] Até aqui tenho falado dos animais que vivem na água; tratarei agora dos terrestres, há os que são desconhecidos nesta nessa parte do mundo. Primeiramente direi das diversas espécies de cobras venenosas. Algumas, chamadas jararacas abundam nos campos, nos matos e até mesmo nas casas, onde não raro as encontramos e cuja mordedura mata no espaço de vinte e quatro horas, ainda que às vezes aplicando-se-lhe remédio se escapa à morte, mordidos daí por diante, não só não corre risco de vida, como até sentem menos dor, como mais de uma vez experimentamos.

Outro gênero se chama boicininga, isto é, “cobra que tine” que tem na cauda um cascavel, que soa quando ataca alguém. Vivem nos campos, em cavidades debaixo da terra. No tempo da procriação atacam os homens, e rastejam pela erva com saltos tão rápidos que os índios dizem que voam. Quando mordem acabou-se: paralisam o ouvido, a vista, o andar e todos os movimentos, só fica a dor e o sentimento do veneno difundido por todo o corpo, até que no espaço de vinte e quatro se expira.

Há outras admiravelmente pintadas de diversas cores, negras, brancas e vermelhas, semelhante ao coral, que se chama *ibiboboca*, que quer dizer “terra cavada”, por que rojando furam a terra como toupeiras. Estas são as mais peçonhentas de todas e, portanto as mais raras [...]”(CARDOSO & WEN, 2003).

As notificações de acidentes ofídicos no Brasil sempre foram feitas de maneira esporádicas e não sistemática. Em 1901, Vital Brazil ao iniciar a produção do soro antiofídico no Brasil e visando a coleta de informações sobre os acidentes ofídicos, introduziu os “Boletins para observação de accidentes ophidicos” que enviados juntamente com as ampolas de soro, deveriam ser preenchidos pelo usuário e devolvidos ao laboratório produtor. Esta estratégia foi adotada pelo Instituto Serumtherapico (hoje Butantan) e posteriormente pelo Instituto Vital Brazil. Os dados originados por estas notificações possibilitaram inúmeras publicações sobre ofididismo no Brasil (CARDOSO & WEN, 2003).

Atualmente, no Brasil os envenenamentos por animais peçonhentos são a segunda principal causa de intoxicações em humanos, com 19,9% dos casos notificados pelo sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (**Quadro 2 e Gráfico 1**) só sendo superados pelas intoxicações provocadas por medicamentos com 30,9% dos casos notificados em 2007 (SINITOX, 2009). Entre os acidentes por animais peçonhentos, o ofídico é o principal deles, por sua frequência e gravidade (**Quadro 1, 2 e Gráfico 1**).

Quadro 1 – Casos e óbitos registrados em acidentes por animais peçonhentos/serpentes por região do Brasil no ano de 2007

	<b>CENTRO OESTE</b>	<b>NORDESTE</b>	<b>NORTE</b>	<b>SUDESTE</b>	<b>SUL</b>
Casos registrados com animais peçonhentos (serpentes)	555	1232	101	503	1155
Óbitos registrados com animais peçonhentos (serpentes)	3	8	1	2	1

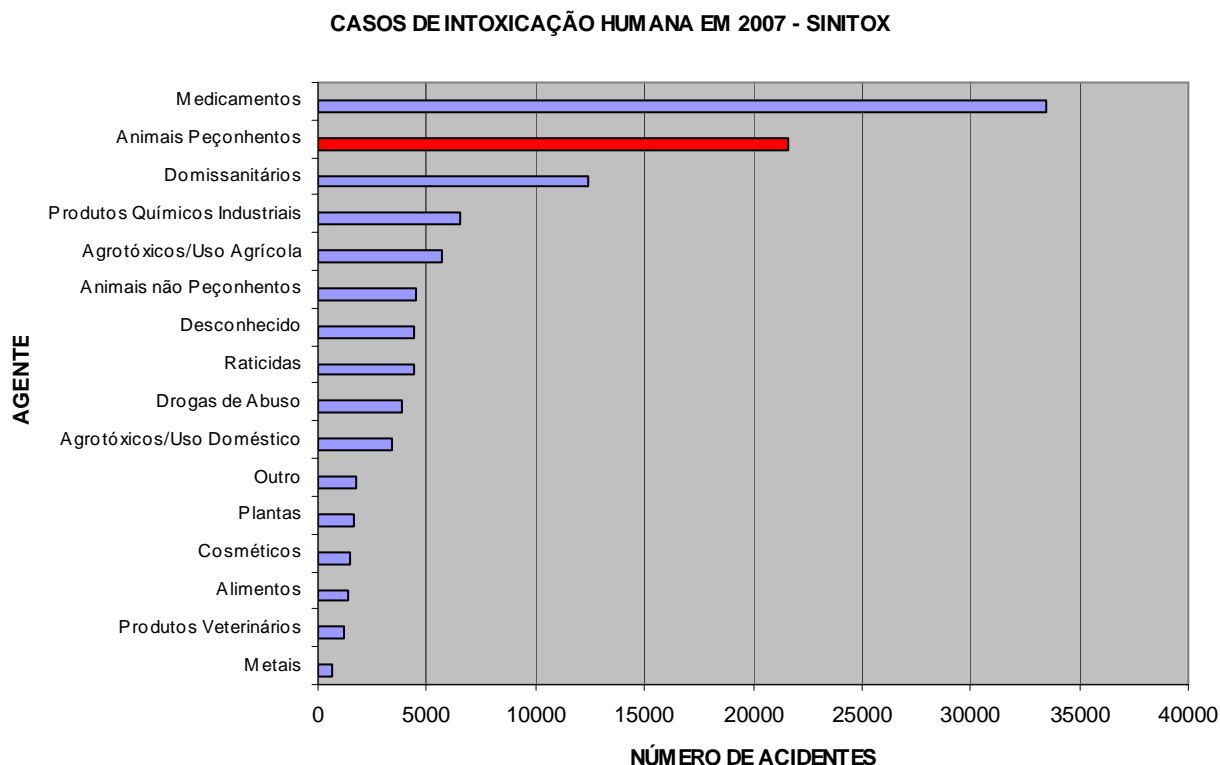
Fonte: MS/Fiocruz/Sinitox

Quadro 2 - Casos de intoxicação humana em 2007 – Sinitox

<b>AGENTE</b>	<b>TOTAL</b>	
	<b>NÚMERO</b>	<b>%</b>
Medicamentos	33445	30,9
Agrotóxicos/Usos Agrícola	5690	5,3
Agrotóxicos/Usos Doméstico	3433	3,2
Produtos Veterinários	1218	1,1
Raticidas	4371	4
Domissanitários	12441	11,5
Cosméticos	1439	1,3
Produtos Químicos Industriais	6524	6
Metais	599	0,6
Drogas de Abuso	3835	3,5
Plantas	1641	1,5
Alimentos	1423	1,3
<b>Animais Peçonhentos</b>	<b>21606</b>	<b>19,9</b>
Animais não Peçonhentos	4533	4,2
Desconhecido	4441	4,1
Outro	1766	1,6
<b>TOTAL</b>	<b>108405</b>	<b>100</b>

Fonte: MS/Fiocruz/Sinitox

Gráfico 1 – Casos de intoxicação humana em 2007 – Sinitox



Os acidentes ofídicos têm grande importância médica e conseqüentemente tornam-se um problema de Saúde Pública em virtude de sua freqüência, gravidade e o despreparo do profissional de saúde da área. A padronização atualizada de condutas de diagnóstico e tratamento dos acidentados é imprescindível. Porém as equipes de saúde, raramente recebem informações desta natureza durante o curso de graduação ou no decorrer da atividade profissional (Brasil, 2001).

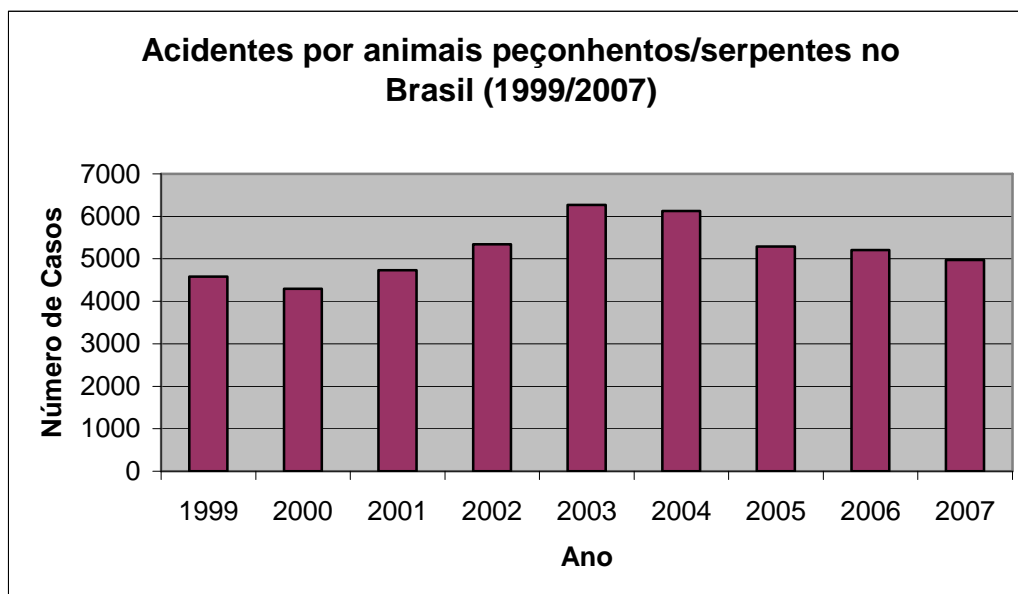
Estão demonstradas no (**Quadro 3 e Gráfico 2**), no Brasil, a incidência dos acidentes ofídicos.

Quadro 3 - Acidentes por animais peçonhentos/serpentes no Brasil (1999-2007)

ANO	NÚMERO DE CASOS
1999	4584
2000	4292
2001	4731
2002	5344
2003	6266
2004	6123
2005	5288
2006	5209
2007	4972
<b>TOTAL</b>	<b>46809</b>

Fonte: MS/Fiocruz/Sinitox

Gráfico 2 - Acidentes por animais peçonhentos/serpentes no Brasil (1999-2007)



A maioria das notificações dos acidentes ofídicos procedentes das regiões meridionais do país está relacionada ao aumento da atividade humana nos trabalhos do campo (preparo da terra, plantio e colheita) nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, cerca de 75% dos casos notificados são atribuídos a serpentes do gênero *Bothrops*, sendo a maioria dos pacientes do sexo masculino (70%), o que é justificado pelo fato do homem desempenhar com mais frequência atividades de trabalho fora da moradia, onde os acidentes ofídicos habitualmente ocorrem. Em aproximadamente 53% das notificações, a faixa etária acometida situou-se entre 15-49 anos, que corresponde ao grupo de idade onde se concentra a força de trabalho. O acometimento dos segmentos pé/perna em 70%, e mão/antebraço, em 13% dos casos notificados, decorre da não utilização de equipamentos mínimos de proteção individual, tais como sapatos, botas, calças, luvas de couro e outros (BRASIL, 2002).

Uma vez que a identificação da serpente causadora do acidente nem sempre é possível, o diagnóstico é baseado em critérios clínicos e epidemiológicos. O acidente botrópico é predominante com 90% dos casos notificados.

### 1.2.1 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

As serpentes do gênero *Bothrops* pertencem à família *Viperidae* que compreende cerca de 30 espécies, estão distribuídas por todo o território nacional. São responsáveis por uma morbidade maior que qualquer outro grupo de serpentes venenosas no Novo Mundo. As espécies mais importantes são *Bothrops asper* na América Central e *Bothrops atrox* e *Bothrops jararaca* na América do Sul. No Brasil, as espécies de *Bothrops* são responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos notificados. Estas serpentes habitam principalmente zonas rurais e periféricas de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores (paióis, celeiros, depósitos de lenha). Têm hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares. Podem apresentar comportamento agressivo quando se sentem ameaçadas, desferindo botes sem produzirem ruídos (BRASIL, 2001).

São muitas as espécies de *Bothrops* consideradas de interesse para a Saúde Pública, com uma ampla distribuição geográfica, e populações importantes nas diversas regiões do país. Dentre elas destacam-se: *Bothrops alternatus*, *Bothrops atrox*, *Bothrops erythromelas*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi* (FUNDACENTRO, 2001), como mostrado no **Quadro 4** e nas **Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7**.

Quadro 4 – Serpentes do gênero *Bothrops* de importância médica no Brasil

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

1. Poucos relatos de casos. Acidentes graves; 2. Responsável pela maioria dos registros de acidentes na região Amazônica; 3. Distúrbios de coagulação são manifestações mais comumente registradas. Acidentes com poucas alterações locais, geralmente benignos; 4. Principal agente em MG, ES, RJ e SP. Casos graves ou óbitos pouco frequentes; 5. Acidentes relatados, principalmente em SC. Acidentes graves ou casos fatais; 6. Responsável pela maioria dos registros de acidentes no oeste de SP e de MG e dos atendimentos em Goiânia/GO; 7. Distribuídas pelo território nacional, com exceção da Amazônia. Siglas: RS-Rio Grande do Sul, SC-Santa Catarina, PR-Paraná, SP-São Paulo, MS-Mato Grosso do Sul, MG-Minas Gerais, AC-Acre, AM-Amazonas, RR-Roraima, PA-Pará, AP-Amapá, MA-Maranhão, RO-Rondônia, TO-Tocantins, CE-Ceará, MT-Mato Grosso, PI-Piauí, RN-Rio Grande do Norte, PB-Paraíba, PE-Pernambuco, AL-Alagoas, SE-Sergipe, BA-Bahia, ES-Espírito Santo, RJ-Rio de Janeiro, DF-Distrito Federal, GO-Góias.  
Fonte: CENEPI, 1998

Figura 1- *Bothrops alternatus*



Figura 2 - *Bothrops atrox*



Figura 3 - *Bothrops erythromelas*



Figura 4 - *Bothrops jararaca*





Figura 5 - *Bothrops jararacussu*



Figura 6 - *Bothrops moojeni*



Figura 7 - *Bothrops neuwiedi*



### **1.3 MECANISMO DE AÇÃO DO VENENO**

As peçonhas das serpentes do gênero *Bothrops* são as mais estudadas de todos os venenos. Mais de 90% do peso seco do veneno é constituído por uma mistura de variados peptídeos e proteínas farmacologicamente ativas que induzem uma grande diversidade de sintomas nos pacientes acidentados. Também estão presentes nos venenos, proteínas não tóxicas. A fração não protéica é composta por carboídratos, lipídios, metais (frequentemente associados à glicoproteínas e metaloproteínases), aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres. A função de cada componente, assim como sua interação no envenenamento humano ainda não está totalmente esclarecida. (WARRELL, 1989; CARDOSO, 2003; BOURGUIGNON, 2001).

O estudo dos venenos de serpentes é de grande importância científica para a elucidação de diversos mecanismos farmacológicos, destacando-se a neurotransmissão na junção neuromuscular, a estrutura e a função dos receptores nicotínicos, a “cascata da coagulação”, a fibrinólise, o sistema complemento, o processo inflamatório e a atividade hemorrágica e miotóxica.

O veneno das serpentes do gênero *Bothrops* é caracterizado por provocar importantes lesões teciduais locais, como hemorragias, necrose e edema, assim como alterações no sistema de coagulação sanguínea. Esses fenômenos fisiopatológicos são devidos a efeitos sinérgicos de enzimas ativas e toxinas presentes nos venenos (OWNBY, 1990; BJARNASON & FOX, 1994 e GUTIERREZ, 1995).

As atividades fisiopatológicas do veneno botrópico são: proteolítica, mais bem definida como inflamatória aguda, coagulante e hemorrágica. Essas atividades são extremamente complexas e podem, usualmente, ser atribuídas a componentes específicos. No entanto, diferentes toxinas podem atuar sinergicamente para induzir um efeito e uma dada toxina pode ter várias atividades (ROSENFELD, 1971).

#### **1.3.1 ATIVIDADE INFLAMATÓRIA AGUDA**

É causada por um conjunto de toxinas do veneno botrópico, responsáveis pelos efeitos locais. Estão envolvidos nesta ação, aminas biogênicas pré-formadas do tipo histamina, peptídeos de baixo peso molecular e proteínas como a fosfolipase A, esterases, proteases, enzimas liberadoras de cininas (calicreínas, cininogenases) e lectinas. Diversas toxinas do veneno têm atividade indireta, induzindo ou liberando potentes autacóides, como a bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina que atuam de modo

bastante complexo e interdependente. Frequentemente, uma única toxina do veneno é capaz de induzir a liberação de várias substâncias com atividade inflamatória.

As toxinas com atividade procoagulante também participam na indução do processo inflamatório com a formação de trombos na corrente microcirculatória, provocando hipóxia, agravamento do edema e necrose tecidual. Os fenômenos hemorrágicos, determinados pelas hemorraginas, podem agravar o quadro inflamatório, através da ativação do Fator de Necrose Tumoral (TNF).

A atividade inflamatória aguda ocorre muito provavelmente devida á interação da ação de diversas toxinas, o que pode explicar a grande variação nos sintomas observados, tanto em estudos experimentais quanto em relatos clínicos (FRANCISCHETTI, e col., 1998; GUTIÉRREZ, 1998; CASTRO, 1999; CAMEY, 2002; FRANÇA & MÁLAQUE, 2003).

### **1.3.2 ATIVIDADE DE COAGULAÇÃO**

O veneno botrópico também possui capacidade de ativar fatores de coagulação sanguínea, ocasionando consumo de fibrinogênio e formação de fibrina intravascular, induzindo frequentemente a incoagulabilidade sanguínea. A grande maioria das serpentes do gênero *Bothrops* possui toxinas capazes de ativar fibrinogênio, protrombina e fator X (NAHAS, 1979). São também descritos fatores com atividade inibitória sobre a agregação plaquetária. Pode ocorrer trombocitopenia nas primeiras horas, persistindo por até alguns dias (FRANÇA & MÁLAQUE, 2003).

### **1.3.3 ATIVIDADE HEMORRÁGICA**

Hemorragia sistêmica é uma das manifestações mais sérias dos envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* em humanos. A hemorragia ocorre em vários órgãos e é responsável por hipovolemia, hipotensão, hipoperfusão tissular, choque cardiovascular e severos acidentes cérebro-vasculares (GUTIÉRREZ, e col., 2009).

## **1.4 ACIDENTE BOTRÓPICO**

Desde a implantação do Programa Nacional de Controle dos Acidentes por Animais Peçonhentos, em 1986, toda a produção dos soros antipeçonhentos produzidos no Brasil é adquirida pelo Ministério da Saúde e distribuída às secretarias estaduais de saúde que, por

sua vez, definem os pontos estratégicos para atendimento dos acidentes e utilização dos antivenenos. Assim garante-se o acesso gratuito e universal ao tratamento soroterápico.

Todavia, faz-se necessário o controle da distribuição e dos estoques nos Estados, de modo a garantir a racionalidade na utilização dos imunobiológicos (BRASIL, 2007).

O quadro clínico local, no acidente botrópico se caracteriza por uma picada que se constitui, na maioria dos casos, em uma inoculação subcutânea ou intramuscular de veneno na vítima. O sangramento no sítio de inoculação é freqüentemente observado, porém sua presença nem sempre indica comprometimento sistêmico. O edema ocorre precocemente, sendo caracteristicamente tenso (ou firme), apresentando muitas vezes tonalidade violácea em decorrência do sangramento subcutâneo. A equimose no local da picada pode acometer porção extensa do membro. O edema inicialmente circunscrito pode em até 24 horas estender-se a todo o membro. Em poucas horas desenvolve-se linfadenomegalia regional, com gânglios aumentados e dolorosos, podendo apresentar equimose no trajeto dos vasos que drenam a região. Algumas horas após o acidente podem aparecer bolhas em quantidade e proporções variáveis, com conteúdo seroso, hemorrágico ou necrótico (FRANÇA & MÁLAQUE, 2003).

#### **1.4.1. GRAVIDADE DO ACIDENTE**

As principais complicações locais são: abscesso, necrose e síndrome compartimental.

Abscesso, celulite e erisipela podem ser observadas no local da inoculação. Estas infecções são freqüentes, devido às condições propícias ao crescimento bacteriano provocado pela reação inflamatória aguda, assim como pela presença de abundante flora bucal nas serpentes (bactérias anaeróbicas e gram-negativas). A incidência de abscessos pode variar de 1 a 17,2% dos casos. Os fenômenos inflamatórios inerentes ao acidente botrópico dificultam a avaliação clínica da presença de infecção. O edema, o eritema, a dor e o calor local podem tanto ser provocados pela ação do veneno, quanto pela infecção local.

A incidência de necrose é bastante variável (de 1 a 20,6%) geralmente limitada ao tecido subcutâneo, podendo comprometer estruturas mais profundas como tendões, músculos e ossos. A intensidade e a extensão da necrose estão intimamente ligadas à utilização de torniquetes e à demora entre o acidente e a administração da soroterapia. Em casos extremos pode ser necessária a amputação de parte do membro acometido (FRANÇA & MÁLAQUE, 2003).

Além do quadro de envenenamento local, o quadro sistêmico é extremamente importante. Pequenos sangramentos como gengivorragias, microhematúria, púrpuras (equimoses em locais longe das picadas, devido a injeções intramusculares ou pequenos traumatismos) e sangramentos em feridas recentes podem ocorrer nos casos leves e moderados. Com menor frequência pode ocorrer hematúria macroscópica, hemoptise, epistaxe, sangramento conjuntival, hipermenorragia e hematêmese (KAMIGUTI & SANOMARTINS, 1995). Em casos graves são observadas hemorragias intensas podendo acometer órgãos vitais, choque e insuficiência renal. São relatadas como causas de óbito, hemorragia digestiva e do sistema nervoso central. A principal complicação sistêmica do acidente botrópico são as insuficiências renais agudas, que podem ser provocadas por coagulação intravascular disseminada e hipotensão.

## **1.5 SOROTERAPIA**

O único tratamento específico, atualmente disponível para o acidente por animais peçonhentos, é a soroterapia, que consiste na aplicação nos pacientes de um soro constituído por um concentrado de anticorpos. A soroterapia tem a finalidade de combater uma doença específica (no caso de doenças infecciosas) ou um agente tóxico específico (venenos ou toxinas).

Com a descoberta do principio da imunização ativa artificialmente induzida e que o sangue dos animais imunizados continha anticorpos, que não só destruíam os agentes invasores, como apresentavam poder terapêutico e profilático, teve início a soroterapia antiofídica (INSTITUTO BUTANTAN, 2006).

Em 1901, Vital Brasil começou a produzir antivenenos mono e poli específicos (Soro Antibotrópico, Anticrotático e Antiofídico) no Instituto Soroterapêutico, localizado na Fazenda Butantan (BRASIL, 1987). Em 1903 publica um trabalho onde resume suas pesquisas na imunologia dos envenenamentos por serpentes (BRAZIL, 1903). Neste trabalho, não somente demonstra exaustivamente a especificidade dos antivenenos, como também da existência, em certos casos, de uma ação paraespecífica, conferindo alguma imunidade cruzada entre espécies filogeneticamente aproximadas. Também apresenta observações sobre vinte e um pacientes tratados com soros anti-peçonhentos produzidos no Instituto Butantan.

Atualmente mais de um século depois, com algumas modificações a soroterapia, como proposta por Calmette e Vital Brasil em 1894, é ainda o único tratamento específico contra os acidentes ofídicos.

Desta forma a soroterapia constitui a principal ferramenta para o tratamento destes acidentes. Sua indicação baseia-se nos critérios clínicos de gravidade (**Quadro 5**). O soro utilizado é constituído de imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de equínos hiperimunizados, com antígeno do gênero *Bothrops*, composto por venenos das serpentes citadas anteriormente.

Cada ampola de soro antiofídico contém 10 mL e neutraliza no mínimo 50 mg de veneno-referência de *B. jararaca* (soroneutralização em camundongos).

Os soros antiofídicos são disponibilizados gratuitamente a população através do Sistema Único de Saúde – SUS, não sendo comercializados nem disponíveis na rede de hospitais privados.

Quadro 5 – Acidente botrópico: Classificação quanto à gravidade e quantidade aproximada de veneno a ser neutralizada

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

(\*) TC normal: até 10 minutos; TC prolongado: de 10 a 30 minutos; TC incoagulável: > 30 minutos

(\*\*) IV = intravenosa

Observação: a determinação do TC tem sido usada como parâmetro da eficácia da dose de antiveneno. Se após 12 horas do início do tratamento o sangue estiver incoagulável, deve-se realizar uma soroterapia adicional para neutralizar 100 mg de veneno.

A administração do soro antiofídico deve ser feita o mais precocemente possível, por via intravenosa, em solução diluída com soro fisiológico (NaCl - 0,9%) ou glicosado (glicose - 0,5%). É importante, após a soroterapia o acompanhamento contínuo de

alterações locais e sistêmicas para a detecção e tratamento precoce das complicações e, eventualmente, a administração de doses adicionais de antiveneno (**Quadro 6**).

Por tratar-se de produto biológico da mais alta relevância para a Saúde Pública o soro antiofídico ideal, deve ser seguro, eficaz e não provocar efeitos adversos quando administrado por via sistêmica.

Quadro 6 - Número de ampolas de soros para tratamento de acidentes ofídicos

ACIDENTE	GRAVIDADE			TIPO DE SORO
	LEVE	MODERADO	GRAVE	
<i>Bothrops jararaca</i>	2 - 4	4 - 8	12	Soro Antibotrópico Soro Antibotrópico-crotálico Soro Antibotrópico-laquéutico

Fonte: CENEPI, 1998

## 1.6 A PRODUÇÃO DE SOROS ANTIPEÇONHENTOS NO BRASIL

Os soros antibotrópicos atualmente utilizados no Brasil são produzidos pelo Instituto Butantan – IB (SP), Instituto Vital Brasil – IVB (RJ) e Fundação Ezequiel Dias – FUNED (MG), através da imunização de cavalos com venenos provenientes das cinco espécies do gênero *Bothrops* mais prevalentes no Brasil: *B. jararaca* – 50%, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. jararacussu* e *B. neuwiedi* – 12,5% cada (BRASIL, 1996), e são distribuídos pelo Ministério da Saúde, através da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Todos seguem o mesmo processo de produção.

### 1.6.1 ETAPAS DA PRODUÇÃO

- Extração do veneno.
- Liofilização
- Tratando-se do botrópico, o veneno proveniente das cinco espécies mais prevalentes no Brasil: (*B. jararaca*: 50%; *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. jararacussu* e *B. neuwiedi*: 12,5% cada) é diluído e injetado em cavalos. Este processo leva 40 dias e é chamado hiperimunização.
- Realização de uma sangria exploratória, retirando uma amostra de sangue para medir o teor de anticorpos produzidos em resposta às injeções do antígeno.

- Dosagem do teor de anticorpos. Ao atingir o nível desejado, é então realizada a sangria final retirando-se cerca de quinze litros de sangue de um cavalo de 500 kg em três etapas, com um intervalo de 48 horas.
- O soro é obtido a partir da purificação e concentração do plasma, onde são encontrados os anticorpos.

Observação: As hemácias são devolvidas ao animal, em um processo chamado plasmaferese. Esta técnica de reposição minimiza os efeitos colaterais provocados pela sangria do animal.

- O soro purificado é concentrado através de ultrafiltração molecular, submetido à filtração clarificante e esterilizante (**Figura 8**).
- O soro é estocado entre 2 e 8 °C e submetido aos testes de controle da qualidade.
- Após o controle da qualidade, o soro é formulado: diluído para alcançar o título desejado (> 5,0 mg/mL), adicionando o conservante fenol (< 0,35%), isotonzado ((NaCl – 0,7 a 0,9%), tendo o pH ajustado na faixa entre 6 e 7 (**Quadro 7**).
- No final do processo, o soro terminado a granel (“bulk”) é novamente submetido a testes de controle da qualidade citados abaixo, para liberação do lote, conforme o preconizado na Farmacopéia Brasileira 4º edição, parte II, 5º fascículo.

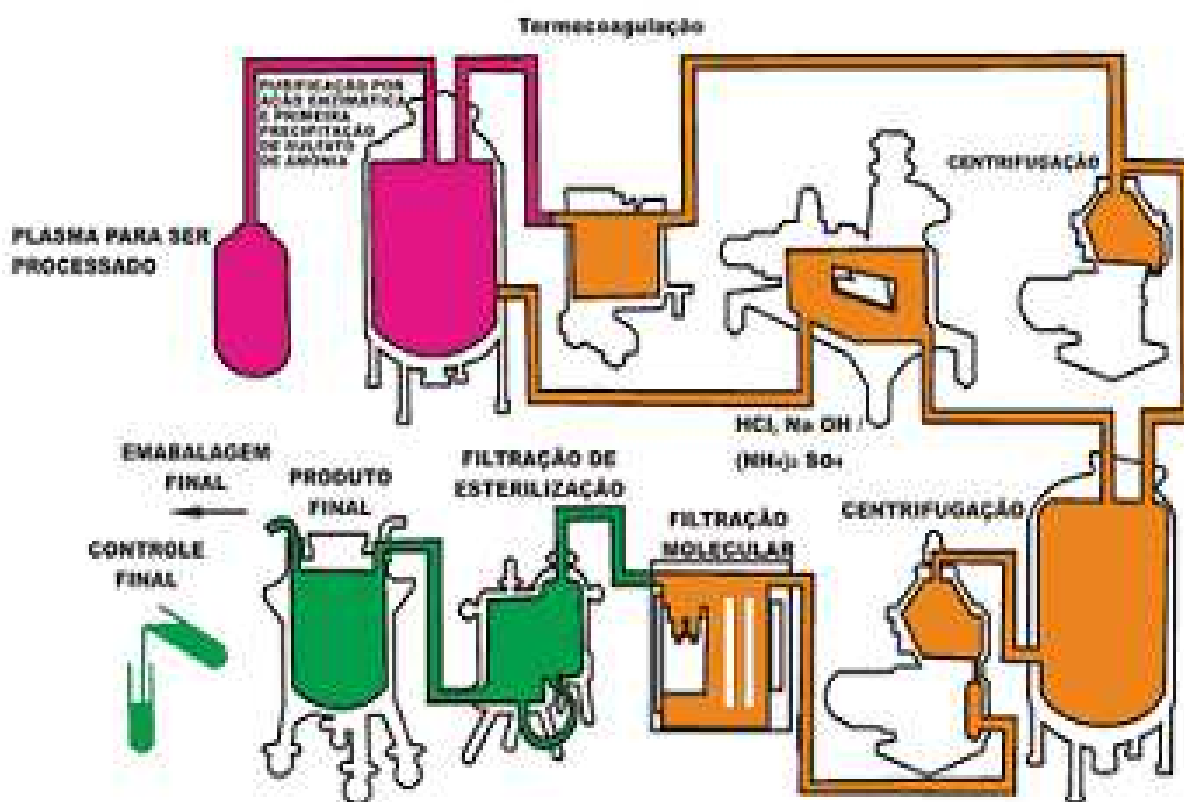


Figura 8 – Processamento do Plasma para obtenção de Soro



Quadro 7 – Fases do processo de produção e controle de soros

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

Fonte: Instituto Butantan (2006)

## 1.7 CONTROLE DA QUALIDADE DE SOROS ANTIPEÇONHENTOS

Todas as metodologias analíticas utilizadas para o controle da qualidade e consequente liberação dos lotes de soros antiofídicos foram realizadas de acordo com as Normas Oficiais Brasileiras, “Imunoserum ad usum humanum e Immunoserum bothropicum”, publicadas pela Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2004), detalhadas na Portaria nº 174, que aprova as normas técnicas de produção e controle da qualidade dos Soros Antiofídicos, Antitóxicos e Anti-rábiticos (BRASIL, 1996).

Os protocolos de determinação da DL<sub>50</sub> e da DE<sub>50</sub> foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz (CEUA), através do protocolo nº 0135/02.

## **1.7.1 TESTES DE CONTROLE DA QUALIDADE DO PRODUTO FINAL**

### **TESTE DE SEGURANÇA BIOLÓGICA:**

- Esterilidade - para a detecção de eventuais contaminações durante a produção.
- Pirogênio - para detectar a presença de substância e contaminantes, que provocam alterações de temperatura nos pacientes (febre).
- Inocuidade – para avaliação de segurança quanto ao uso humano (realizada até 2001).

**TESTES FÍSICO-QUÍMICOS** (são utilizados para qualificar e quantificar os componentes do soro):

- Determinação do volume médio, teor de fenol, teor de sulfato de amônia, pH, teor de cloreto de sódio, proteínas e nitrogênio protéico.

### **ATIVIDADE BIOLÓGICA:**

- Determinação da potência (DE<sub>50</sub>) (para verificação da quantidade de anticorpos produzidos).

Um soro ideal deve ser seguro e eficaz, portanto não deve provocar efeitos adversos quando administrado por via sistêmica, além de ter baixo custo. Bioquimicamente, o melhor soro deve apresentar uma alta pureza e potência, com um mínimo de conteúdo de proteínas totais. Clinicamente, é aquele que apresente a melhor eficiência terapêutica com a menor dose e sem efeitos colaterais, e economicamente falando, é aquele que oferece o melhor balanço entre eficácia terapêutica e custos.

A segurança e eficácia da imunoterapia anti-venenamento estão intimamente relacionadas à pureza e a uma cuidadosa determinação da potência do soro (WHO, 1969).

## **1.8 RELEVÂNCIA DO ESTUDO**

Pelo exposto, com o objetivo de aperfeiçoar o ensaio de potência do soro antibotrópico, torna-se necessário o estabelecimento do Veneno Botrópico de Referência (lote 05) e do Soro Antibotrópico de Referência (lote 01) através de um estudo interlaboratorial para a validação do ensaio de potencia relativa e da atividade biológica do Soro Antibotrópico de Referência Nacional.

Com os resultados obtidos neste estudo, também será possível qualificar a metodologia oficial, preconizada pela Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2004) e pelo Procedimento Operacional do INCQS (POP 65.3440.004).

Portanto, consideramos este estudo de relevância para a Saúde Pública e conseqüentemente para a Vigilância Sanitária do Brasil.

### **1.8.1 A INSERÇÃO DO INCQS NESTE ESTUDO**

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), pertencente à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) no Rio de Janeiro (RJ) tem como missão, “Contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle de qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária”. Desta forma se justifica realizar o presente estudo. Desde 1986, o INCQS tem como atividade o Controle de Qualidade dos soros antipeçonhentos, dentre eles o soro antitoxinotrópico. No parque industrial nacional de imunobiológicos, temos o IB – SP, IVB – RJ e FUNED – MG responsáveis pela produção. A utilização e distribuição no país estão sob a Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações (CGPNI) do Ministério da Saúde. É importante ressaltar que todos os lotes produzidos são analisados, antes da liberação, pelo INCQS.

### **1.9 ESTUDO COLABORATIVO**

De acordo com as recomendações de “Workshop on the Standardization and Control of Antivenoms”, coordenado pela “Quality Assurance and Safety of Biologicals Unit” da OMS (THEAKSTON, 2003) “o estabelecimento de venenos e antivenenos de referência é essencial para a padronização destes ensaios de modo a permitir a comparação lote a lote, assim como a comparação entre laboratórios. Idealmente as atividades dos antivenenos devem ser expressas em unidades neutralizantes de toxina baseada em um padrão nacional e regional”, certamente esta é a principal recomendação deste Workshop.

Com este objetivo foi estabelecido no INCQS um soro antitoxinotrópico de referência, parte importante deste estudo. Foi originário de soros antitoxinotrópicos de produção rotineira, enviadas e analisadas pelos produtores nacionais e também pelo INCQS.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Aperfeiçoar a metodologia analítica para a determinação da potência do Soro Antibotrópico de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS).

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Coordenar o estudo colaborativo e definir o protocolo de trabalho.
- Estabelecer o soro antibotrópico de referência.
- Estabelecer a  $DL_{50}$  do veneno botrópico de referência.

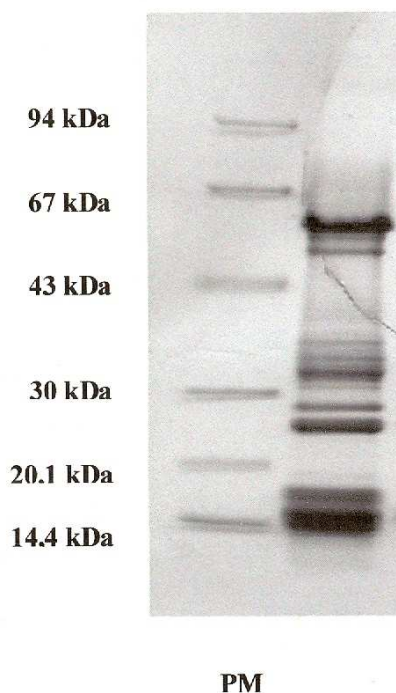
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 VENENO BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA (BRA/BOT/05)

O lote nº 05 do Veneno Botrópico de Referência – BRA/BOT/05, é uma preparação liofilizada com 4.398 frascos de veneno de *Bothrops jararaca* estocado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , contendo 30 mg/frasco, com uma  $DL_{50}$  de  $47,8\text{ }\mu\text{g}/0,5\text{ mL}$ , determinada pelo INCQS e uma  $DL_{50}$  de  $33,1\mu\text{g}/0,5\text{ mL}$  determinada pelo Instituto Butantan no momento de sua preparação. Consiste em um “pool” obtido partir de 4.430 extrações de veneno de *Bothrops jararaca* coletadas em diferentes regiões do Brasil. Este “pool” foi obtido por 2.180 extrações de serpentes coletadas no estado de São Paulo (49,2%); 1.073 coletadas no Espírito Santo (24,2%); 691 em Santa Catarina (15,6%); 448 no Paraná (10,1%); 34 em Minas Gerais (0,77%) e 04 no Rio de Janeiro (0,09%). Possui  $907,60 \pm 40,30\text{ }\mu\text{g}$  de proteína/mg de veneno e um perfil eletroforético em SDS-PAGE (gradiente de 7,5% a 17,5%, corado por Azul de Coomassie), com 12 bandas de proteínas, sendo cinco bandas predominantes, com pesos moleculares de 62, 32, 28 e 14,4 kDa (**Figura 9**). Este lote foi preparado e caracterizado em 2002 pelo Instituto Butantan e é utilizado pelo INCQS e todos os laboratórios produtores até a presente data.

Figura 9: Perfil eletroforético do Veneno Botrópico de Referência lote 05 – BRA/BOT/05.



### **3.1.2 SORO ANTIBOTRÓPICO DE REFERÊNCIA (BRA/ANTIBOT/01)**

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

### **3.1.3 ANIMAIS UTILIZADOS**

Nos ensaios *in vivo* para o estabelecimento do Soro Antibotrópico de Referência Nacional foram utilizados camundongos suíço-albinos de 18 a 22 gramas de ambos os sexos, sadios, procedentes do CECAL da Fiocruz e aclimatados no SAL do INCQS (temperatura de 23 °C ± 2 °C, umidade aproximadamente de 70% e fotoperíodo com ciclos de oito horas), mantidos em gaiolas plásticas e tampa de aço inoxidável, com maravalha autoclavada.

Este ensaio foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz (CEUA), através do protocolo nº 0135/02.

Quadro 8 - Relação dos lotes do “pool” do candidato a Soro Antibotrópico de Referência.

AMOSTRA	LOTE	PRODUTOR	QUANTIDADE	TOTAL
1298/00	0004052-A	I. Butantan	10	
1299/00	0004052-B	I. Butantan	10	
1300/00	0004052-C	I. Butantan	10	
3762/98	9807070-A	I. Butantan	15	
3763/98	9807070-B	I. Butantan	15	
3764/98	9807070-C	I. Butantan	15	
3093/98	980043-A	I. Butantan	10	160
3094/98	980043-B	I. Butantan	15	
3095/98	980043-C	I. Butantan	15	
4277/98	9808078-A	I. Butantan	15	
4278/98	9808078-B	I. Butantan	15	
4279/98	9808078-C	I. Butantan	15	
1102/98	980201	I. Vital Brazil	18	
3483/98	980604-A	I. Vital Brazil	14	
3484/98	980604-B	I. Vital Brazil	14	
4828/98	980707	I. Vital Brazil	21	
5242/98	980909	I. Vital Brazil	26	123
1986/00	991113	I. Vital Brazil	19	
3470/00	000801	I. Vital Brazil	03	
4254/00	000905	I. Vital Brazil	03	
4570/00	000902	I. Vital Brazil	02	
5166/00	001110	I. Vital Brazil	03	
3235/98	97070815	FUNED	10	
4980/98	971015/20	FUNED	15	
5474/98	980929/05-B	FUNED	15	
5476/98	980929/05-C	FUNED	23	119
2967/99	990504-18	FUNED	21	
3492/99	990517-22	FUNED	16	
4670/99	990915-45	FUNED	19	
418/00	B02/99	CPPI	21	21
TOTAL				423*

\*Foram utilizadas 384 ampolas. Das 423, inicialmente propostas, 39 ampolas dos diferentes produtores, foram quebradas na confecção do “pool”.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 SORONEUTRALIZAÇÃO

O método utilizado teve como base a soroneutralização *in vitro* e posterior inoculação em camundongos, como preconizado pela Farmacopéia Brasileira 4ª edição, parte II, 5º fascículo.

### 3.2.2 OBTENÇÃO DO “POOL” DE SORO ANTIBOTRÓPICO E DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DO SORO CANDIDATO À REFERÊNCIA

O Setor de soros antipeçonhentos do INCQS utilizou 384 ampolas contendo 10 mL de soro antibotrópico dos diferentes produtores nacionais para fazer um “pool” do candidato a Soro Antibotrópico de Referência Nacional (**Quadro 8**).

Foram realizados pelo INCQS oito ensaios para o estabelecimento da DE<sub>50</sub> do soro antibotrópico de referência. O resultado final expresso em valor médio da DE<sub>50</sub>, seus limites inferior e superior foram obtidos pelo método de combinação dos resultados através da média ponderada referendado pela Farmacopéia Européia (Council of Europe, 2008) (**Quadro 9, Gráfico 3**). A homogeneidade dos resultados dos ensaios foi avaliada pelos testes de Qui-quadrado e de Grubbs. A DE<sub>50</sub> obtida foi 27,63 µg/dose, com um limite inferior de 26,22 µg/dose e um limite superior de 29,1 µg/dose (**Quadro 10**), que corresponde a uma potência de **6,92 mg/mL**, com um limite inferior de 6,57 mg/mL e um limite superior de 7,29 mg/mL.



Quadro 9 – Determinação das doses efetivas médias (DE<sub>50</sub>) do Soro Antibotrópico candidato à Referência - combinação de 8 ensaios.

DE <sub>50</sub>	LI	LS
27,66	22,85	33,48
26,82	23,23	30,96
27,61	23,25	32,78
33,48	27,15	41,29
26,75	22,25	32,18
24,94	21,66	28,71
25,93	22,97	29,28
32,25	27,92	37,24

### Teste de Homogeneidade

X <sup>2</sup> calc	p	X <sup>2</sup> tab
12,479	0,0859	14,067

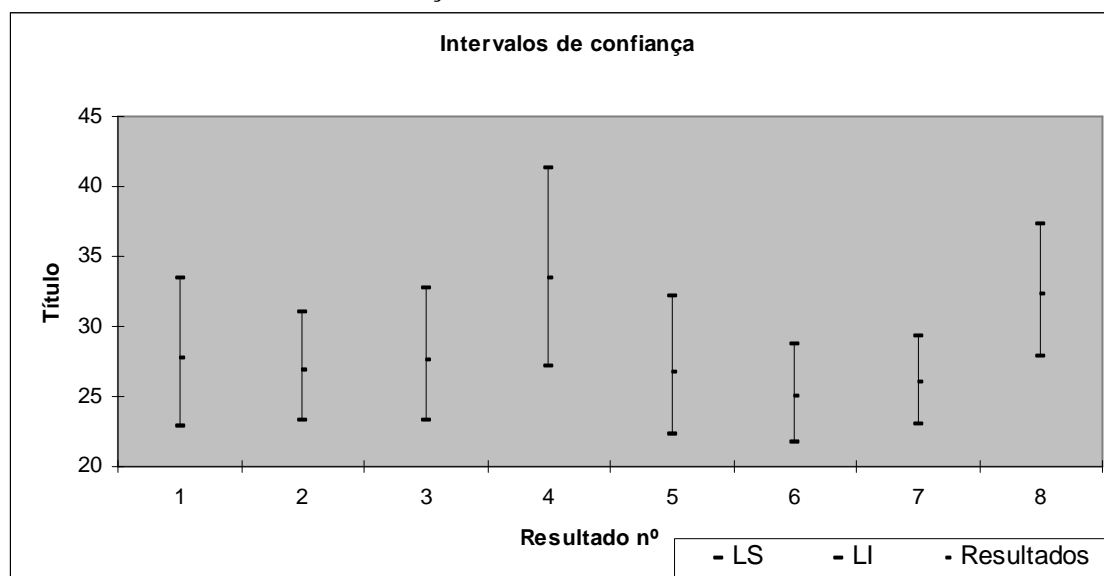
### Dados homogêneos

DE <sub>50</sub>	27,63	µg/dose
LI	26,22	µg/dose
LS	29,11	µg/dose

Potência	6,92	mg/mL
LI	6,57	mg/mL
LS	7,29	mg/mL

DE<sub>50</sub>: dose efetiva média; LI: limite inferior; LS: limite superior; X<sup>2</sup>calc: qui-quadrado calculado; X<sup>2</sup>tab: qui-quadrado tabelado e p: valor de probabilidade.

Gráfico 3 – Determinação das doses efetivas médias (DE<sub>50</sub>) do Soro Antibotrópico candidato a Referência - combinação de 8 ensaios.



Quadro 10 – DE<sub>50</sub> do Soro Antibotrópico de Referência - BRA/ANTIBOT/01

CÁLCULO DA DE <sub>50</sub>	
<b>LIMITE INFERIOR</b> μg/dose	26,22
<b>DE<sub>50</sub></b> μg/dose	<b>27,63</b>
<b>LIMITE SUPERIOR</b> μg/dose	29,11

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

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

TV = número de DL<sub>50</sub> utilizadas por camundongo na dose teste de veneno.

$$\text{Potência} = \frac{(4) \times 47,85}{27,63} = \mathbf{6,92 \text{ mg/mL}}$$

### 3.2.3 DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL MÉDIA (DL<sub>50</sub>) DO VENENO DE REFERENCIA

Reconstituiu-se a preparação do veneno bruto liofilizado na concentração de 1 mg/mL em NaCl 0,85%. Foram efetuadas diluições em progressão geométrica, utilizando fator de diluição constante, não superior a 1,5 e igualando os volumes finais (**Quadro 11**).

Foi inoculado com seringa de 1 mL, por via intraperitoneal, volume de 0,5 mL por camundongo de cada diluição em grupos de, no mínimo, 10 camundongos suíço-albinos de 18 a 22 gramas. Os animais foram observados no período de 24 e 48 horas após inoculação e o número de mortos em cada diluição foi registrado. Os animais sobreviventes foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>. A DL<sub>50</sub> foi calculada, utilizando o método estatístico de probitos (FINNEY, 1971). A faixa de resposta (porcentagem de mortes) deve estar compreendida entre 10% e 90%, obtendo a curva de regressão que deve apresentar relação linear. Os limites de confiança não devem ser amplos, indicando melhor precisão do ensaio. Expressar o resultado em microgramas de veneno por 0,5 mL.

Quadro 11 – Protocolo de diluição para determinação da DL<sub>50</sub>

VENENO/CAMUNDONGO	SOLUÇÃO DE VENENO (1 mg/mL)	SALINA
62,2 µg	0,74 mL	5,26 mL
51,8 µg	0,62 mL	5,38 mL
43,2 µg	0,51 mL	5,49 mL
36,0 µg	0,43 mL	5,57 mL
30,0 µg	0,36 mL	5,64 mL

Fonte: Manual da Qualidade do INCQS, POP nº 65.3440.006.

### 3.2.3.1 CRITÉRIOS PARA ACEITAÇÃO DO ENSAIO

- A DL<sub>50</sub> do veneno deve estar dentro dos limites de confiança compreendidos entre 50 e 200% do valor nominal do veneno de referência. O cálculo para a determinação da DL<sub>50</sub> foi feito através do método estatístico de probitos (FINNEY, 1971) utilizando programa fornecido pela OMS (WHOPROG, 1997).
- Os animais utilizados no ensaio devem morrer proporcionalmente à quantidade do veneno presente na diluição em pelo menos três diluições consecutivas.
- A faixa de resposta (porcentagem de mortos) deve estar compreendida entre 10 e 90%, obtendo a curva de regressão que deve apresentar relação linear, ou seja, desvio de linearidade não significativo ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.4 DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DO SORO ANTIBOTRÓPICO

Foram efetuadas diluições progressivas do soro em solução fisiológica a 0,85 %, utilizando fator de diluição constante, não superior a 1,5 de maneira que o volume final após a mistura com a dose desafio de veneno seja idêntico em todos os tubos de ensaio. O veneno de referência foi reconstituído e diluído para uma solução contendo 1 mg/mL com solução de cloreto de sódio a 0,85 %. Foi adicionado em cada tubo um volume constante de veneno, de modo que cada dose a ser inoculada por animal contenha 5 DL<sub>50</sub> (**Quadro 12**). A mistura foi homogenizada e incubada a 37 °C por 60 minutos. Foi inoculado com seringa de 1 mL, por via intraperitoneal o volume de 0,5 mL por camundongo, de cada mistura, em grupos de, no mínimo, 8 camundongos suíço-albinos de 18 a 22 g. Os animais foram observados no período de 24 e 48 horas após inoculação o número de sobreviventes de cada diluição foi registrado. A DE<sub>50</sub> em microlitros, foi calculada utilizando método estatístico de probitos (FINNEY, 1971).

A potência em miligramas por mililitro foi calculada, utilizando a equação:

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

TV = número de DL<sub>50</sub> utilizadas por camundongo na dose teste de veneno.

O título da potência foi expresso em miligramas de veneno neutralizados/1 mL de soro.

Quadro 12 – Protocolo de diluição para o ensaio de soroneutralização (DE<sub>50</sub>)

VENENO (1mg/mL)	SORO	SALINA
2,8 mL	0,50 mL	2,70 mL
2,8 mL	0,38 mL	2,82 mL
2,8 mL	0,29 mL	2,91 mL
2,8 mL	0,22 mL	2,98 mL

Fonte: Manual da Qualidade do INCQS, POP nº 65.3440.004.

### 3.2.4.1 CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO DO ENSAIO

- O ensaio de determinação da atividade do veneno de referência usando 5 DL<sub>50</sub> do veneno deve estar dentro dos limites de confiança (90 a 100% de mortes);
- Os animais utilizados no ensaio de soroneutralização deverão sobreviver proporcionalmente à quantidade de soro presente na diluição;
- No caso do ensaio da amostra se tornar inválido, pode-se repetir utilizando outra faixa de diluição de acordo com a leitura observada;
- Para o cálculo da DE<sub>50</sub> deve-se levar em conta: o limite de confiança deve estar compreendido entre 50 e 200% da potência estimada; a faixa de resposta (porcentagem de sobrevivência) deve estar compreendida entre 10 e 90%, obtendo a curva de regressão que deve apresentar relação linear ( $p > 0,05$ ) utilizando-se o resultado de, pelo menos, três diluições consecutivas, sendo que a dose que protege 50% deve estar no intervalo compreendido entre a maior e a menor diluição do ensaio.
- O produto é considerado satisfatório se a potência for, no mínimo, igual a 5 mg de veneno/mL de soro.

### **3.2.4.2 VALORES ABERRANTES**

Com o objetivo de avaliar a homogeneidade dos resultados identificando valores aberrantes, os grupos de resultados foram submetidos aos testes de Grubbs e de Qui-quadrado em planilha de Combinação Ponderada de Ensaio, desenvolvida e validada de acordo com a Farmacopéia Européia (Council of Europe, 2008), os valores identificados como aberrantes foram eliminados dos cálculos.

### **3.2.5 PROTOCOLO DO ESTUDO COLABORATIVO UTILIZADO (conforme enviado aos produtores).**

#### **1º Etapa: Reavaliação da potência do lote nº 05 do Veneno Botrópico de Referência BRA/BOT/05 e a avaliação da potência do candidato a Soro Antibotrópico de Referência Nacional (BRA/ANTIBOT/01).**

Foram realizados três ensaios independentes (repetições em momentos diferentes) das seguintes determinações:

- Determinação da  $DE_{50}$  do Soro Antibotrópico de Referência Nacional (BRA/ANTIBOT/01). Esta determinação deverá ser em duplicata.
- Determinação da  $DL_{50}$  do Veneno Botrópico de Referência BRA/BOT/05. Esta determinação foi feita em paralelo com as determinações da  $DE_{50}$  e potência do Soro de Referência.
- Avaliação da aplicabilidade de um controle de veneno paralelamente a cada determinação de potência deverá ser inoculado com 5  $DL_{50}$  um grupo de 10 animais.

### 3.2.5.1 MATERIAL

**BRA/ANTIBOT/01:** Foram enviados para cada laboratório 12 frascos do soro candidato, para a determinação da potência em unidades neutralizantes (UN) e para a comparação entre as metodologias de determinação da potência pela DE<sub>50</sub> e pela Potência Relativa.

**BRA/BOT/05:** Foram enviados para cada laboratório 05 frascos de veneno botrópico de referência.

E o protocolo do estudo colaborativo está no Anexo 1.

### 3.2.6 COLETA E ANÁLISE DOS DADOS

O INCQS foi responsável pelo recebimento, revisão e codificação dos dados submetidos pelos laboratórios participantes, pela análise estatística e interpretação dos resultados. Os laboratórios foram identificados por um código em todas as análises para manter a confidencialidade dos resultados. Um relatório final será preparado posteriormente e distribuído para todos os participantes.

A potência do Veneno Botrópico de Referência foi expressa em quantidade de veneno, em µg/0,5 mL capaz de causar a morte em 50% dos animais inoculados (DL<sub>50</sub>). A potência dos soros antibotrópicos foi expressa na quantidade de veneno de referência (em mg) neutralizado por 1 mL de Soro Antibotrópico (mg/mL). O INCQS utilizou planilha eletrônica desenvolvida e distribuída pela Organização Mundial de Saúde (WHOPROG, 1997). Os dados brutos de todos os laboratórios foram calculados pelo INCQS utilizando a planilha da OMS do referido programa.

Todos os ensaios foram revalidados quanto a sua validade de acordo com os seguintes critérios:

- os animais utilizados deverão morrer/sobreviver proporcionalmente à dose de veneno/soro presentes nas diluições;
- deve ser utilizado, para efeito do cálculo, o resultado de pelo menos 03 (três) diluições consecutivas;
- a dose letal/efetiva 50% deve estar no intervalo compreendido entre a maior e a menor diluição utilizada.

A determinação da DL<sub>50</sub> e DE<sub>50</sub> foi feita pelo método dos probitos. A precisão intraensaio (repetibilidade), interensaios (precisão intermediária) e interlaboratórios (reprodutibilidade) dos ensaios de potência do Veneno Botrópico e do Soro Antibotrópico

foram calculadas através do coeficiente de variação (CV) de acordo com a seguinte fórmula: (TIAN, 2005)

$$CV = \frac{(\text{Desvio Padrão})}{\text{Média}} \times 100.$$

### **3.2.6.1 CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO**

Os materiais de referência (soros e venenos) serão considerados aptos, caso a precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) dos ensaios de DE<sub>50</sub> do soro e da DL<sub>50</sub> do veneno apresentem coeficientes de variação inferiores a 50% (WHO, 1997; van der Ark e cols, 2000). A metodologia da potência relativa será considerada aplicável, caso a precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) seja maior do que para a potência absoluta, ou seja, apresente coeficientes de variação (CV) inferiores aqueles observados para a potência absoluta. A aplicabilidade da implantação da metodologia, caso seja considerada apta, deverá ser definida após uma avaliação de custo benefício.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 RESULTADOS**

Este estudo foi inicialmente proposto para ser realizado em duas etapas, porém devido ao prazo de defesa desta dissertação de Mestrado Profissional (24 meses), e tendo em vista que todos os resultados não foram remetidos em tempo hábil para a inclusão neste trabalho, iremos abordar somente os resultados referentes à primeira etapa do estudo.

A primeira etapa compreendeu a reavaliação da potência do lote nº 05 do Veneno Botrópico de Referência Nacional BRA/BOT/05 e a avaliação da potência do candidato a Soro Antibotrópico de Referência Nacional BRA/ANTIBOT/01. Da segunda etapa só foram utilizados, para efeito dos cálculos os valores médios referentes às potências determinadas do soro BRA/ANTIBOT/01.

Este estudo ainda mostrou que os resultados obtidos permitiram a avaliação das precisões intraensaios, interensaios e interlaboratórios dos ensaios de potência do veneno botrópico e do soro antibotrópico, a frequência e causas dos ensaios inválidos assim como as diferentes interpretações dos laboratórios à monografia do *Soro Antibotrópico* da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2004).

#### **A. Determinação da $DL_{50}$ do Veneno Botrópico de Referência BRA/BOT/05**

Foi solicitado que cada laboratório realizasse três ensaios independentes (repetições em momentos diferentes) para determinação da  $DL_{50}$  do Veneno Botrópico de Referência BRA/BOT/05. Observamos que os laboratórios 01 e 02 realizaram cinco ensaios, portanto dois acima do solicitado.



## LABORATÓRIO: INCQS

Ensaio de DL<sub>50</sub> n°: 1      Data: 15/04/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL  
Fator de diluição do veneno: 1,2

Diluição	Concentração de Veneno (µg)	Salina (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de mortos em 48 horas
1	62,2	5,26	0,74	10	8
2	51,8	5,38	0,62	10	8
3	43,2	5,49	0,51	10	7
4	36,0	5,57	0,43	10	5
5	30,0	5,64	0,36	10	0

**DL<sub>50</sub> 39,69 µg/0,5 mL**

Ensaio de DL<sub>50</sub> n°: 2      Data: 30/04/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL  
Fator de diluição do veneno: 1,2

Diluição	Concentração de Veneno (µg)	Salina (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de mortos em 48 horas
1	62,2	5,26	0,74	10	9
2	51,8	5,38	0,62	10	8
3	43,2	5,49	0,51	10	5
4	36,0	5,57	0,43	10	4
5	30,0	5,64	0,36	10	0

**DL<sub>50</sub> 42,53 µg/0,5 mL**

Ensaio de DL<sub>50</sub> n°: 3      Data: 14/05/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL  
Fator de diluição do veneno: 1,2

Diluição	Concentração de Veneno (µg)	Salina (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de mortos em 48 horas
1	62,2	5,26	0,74	10	9
2	51,8	5,38	0,62	10	9
3	43,2	5,49	0,51	10	5
4	36,0	5,57	0,43	10	3
5	30,0	5,64	0,36	10	1

**DL<sub>50</sub> 40,96 µg/0,5 mL**

## LABORATÓRIO: 01

Ensaio de DL<sub>50</sub> n°: 1      Data: 08/02/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL  
Fator de diluição do veneno: 1,2

Diluição	Concentração de Veneno (µg)	Salina (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de mortos em 48 horas
1	62,2	5,26	0,74	10	6
2	51,8	5,38	0,62	10	9
3	43,2	5,49	0,51	10	8
4	36,0	5,57	0,43	10	7
5	30,0	5,64	0,36	10	5

### DL<sub>50</sub> Inválido

Ensaio de DL<sub>50</sub> n°: 2      Data: 12/02/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL  
Fator de diluição do veneno: 1,2

Diluição	Concentração de Veneno (µg)	Salina (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de mortos em 48 horas
1	62,2	5,26	0,74	10	9
2	51,8	5,38	0,62	10	5
3	43,2	5,49	0,51	10	7
4	36,0	5,57	0,43	10	4
5	30,0	5,64	0,36	10	1

**DL<sub>50</sub>      38,49 µg/0,5 mL**

Ensaio de DL<sub>50</sub> n°: 3      Data: 13/02/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL  
Fator de diluição do veneno: 1,2

Diluição	Concentração de Veneno (µg)	Salina (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de mortos em 48 horas
1	62,2	5,26	0,74	10	6
2	51,8	5,38	0,62	10	7
3	43,2	5,49	0,51	10	8
4	36,0	5,57	0,43	09	4
5	30,0	5,64	0,36	10	2

**DL<sub>50</sub>      36,78 µg/0,5 mL**

Ensaio de DL<sub>50</sub> n°: 4      Data: 14/02/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL  
Fator de diluição do veneno: 1,2

Diluição	Concentração de Veneno (µg)	Salina (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de mortos em 48 horas
1	62,2	5,26	0,74	10	9
2	51,8	5,38	0,62	10	9
3	43,2	5,49	0,51	10	5
4	36,0	5,57	0,43	10	6
5	30,0	5,64	0,36	10	7

**DL<sub>50</sub>      Inválido**

Ensaio de DL<sub>50</sub> n°: 5      Data: 03/04/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL  
Fator de diluição do veneno: 1,2

Diluição	Concentração de Veneno (µg)	Salina (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de mortos em 48 horas
1	62,2	5,26	0,74	10	10
2	51,8	5,38	0,62	10	8
3	43,2	5,49	0,51	10	6
4	36,0	5,57	0,43	10	8
5	30,0	5,64	0,36	10	2

**DL<sub>50</sub>      Inválido**

**LABORATÓRIO: 02**

Ensaio de DL<sub>50</sub> n°: 1      Data: 02/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL  
Fator de diluição do veneno: 1,2

Diluição	Concentração de Veneno (µg)	Salina (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de mortos em 48 horas
1	62,2	5,26	0,74	10	6
2	51,8	5,38	0,62	10	8
3	43,2	5,49	0,51	10	4
4	36,0	5,57	0,43	10	3
5	30,0	5,64	0,36	10	0

**DL<sub>50</sub>      43,62 µg/0,5 mL**

Ensaio de DL<sub>50</sub> n°: 2      Data: 02/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL  
Fator de diluição do veneno: 1,2

Diluição	Concentração de Veneno (µg)	Salina (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de mortos em 48 horas
1	62,2	5,26	0,74	10	7
2	51,8	5,38	0,62	10	1
3	43,2	5,49	0,51	10	1
4	36,0	5,57	0,43	10	1
5	30,0	5,64	0,36	10	0

**DL<sub>50</sub>      59,76 µg/0,5 mL**

Ensaio de DL<sub>50</sub> n°: 3      Data: 03/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL  
Fator de diluição do veneno: 1,2

Diluição	Concentração de Veneno (µg)	Salina (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de mortos em 48 horas
1	62,2	5,26	0,74	10	2
2	51,8	5,38	0,62	10	5
3	43,2	5,49	0,51	10	3
4	36,0	5,57	0,43	10	1
5	30,0	5,64	0,36	10	0

**DL<sub>50</sub>      Inválido**

Ensaio de DL<sub>50</sub> n°: 4      Data: 14/02/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL  
Fator de diluição do veneno: 1,2

Diluição	Concentração de Veneno (µg)	Salina (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de mortos em 48 horas
1	62,2	5,26	0,74	10	7
2	51,8	5,38	0,62	10	7
3	43,2	5,49	0,51	10	4
4	36,0	5,57	0,43	10	8
5	30,0	5,64	0,36	10	1

**DL<sub>50</sub>    Inválido**

Ensaio de DL<sub>50</sub> n°: 5      Data: 05/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL  
Fator de diluição do veneno: 1,2

Diluição	Concentração de Veneno (µg)	Salina (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de mortos em 48 horas
1	62,2	5,26	0,74	10	7
2	51,8	5,38	0,62	10	4
3	43,2	5,49	0,51	10	9
4	36,0	5,57	0,43	10	2
5	30,0	5,64	0,36	10	0

**DL<sub>50</sub>    38,72 µg/0,5 mL**

### LABORATÓRIO 03

Ensaio de DL<sub>50</sub> n°: 1      Data: 20/03/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL  
Fator de diluição do veneno: 1,2

Diluição	Concentração de Veneno (µg)	Salina (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de mortos em 48 horas
1	62,2	5,26	0,74	10	9
2	51,8	5,38	0,62	10	8
3	43,2	5,49	0,51	10	6
4	36,0	5,57	0,43	10	3
5	30,0	5,64	0,36	10	1

**DL<sub>50</sub> 41,57 µg/0,5mL**

Ensaio de DL<sub>50</sub> n°: 2      Data: 26/03/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL  
Fator de diluição do veneno: 1,2

Diluição	Concentração de Veneno (µg)	Salina (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de mortos em 48 horas
1	62,2	5,26	0,74	10	9
2	51,8	5,38	0,62	10	8
3	43,2	5,49	0,51	10	7
4	36,0	5,57	0,43	10	5
5	30,0	5,64	0,36	10	1

**DL<sub>50</sub> 39,01 µg/0,5mL**

Ensaio de DL<sub>50</sub> n°: 3      Data: 28/03/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL  
Fator de diluição do veneno: 1,2

Diluição	Concentração de Veneno (µg)	Salina (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de mortos em 48 horas
1	62,2	5,26	0,74	10	9
2	51,8	5,38	0,62	10	8
3	43,2	5,49	0,51	10	6
4	36,0	5,57	0,43	10	2
5	30,0	5,64	0,36	10	1

**DL<sub>50</sub> 42,42 µg/0,5mL**

Na avaliação dos resultados apresentados, ficou demonstrada que cada laboratório interpreta diferentemente as recomendações da Farmacopéia Brasileira, monografia de *Soro Antibotrópico* (BRASIL, 2004) que estabelece critérios para a aceitação do ensaio de determinação da DL<sub>50</sub> do Veneno Botrópico de referência como válido.

A Farmacopéia Brasileira preconiza que:

“A faixa de resposta (porcentagem de mortes) deve estar compreendida entre 10% e 90%, formando a curva de regressão que deve apresentar relação linear. Os limites de confiança não devem ser amplos, indicando melhor precisão do ensaio quanto menor forem os seus limites. Expressar o resultado em microgramas de veneno por 0,5 ml”.

O INCQS em seu Procedimento Operacional Padronizado nº 65.3440.006 “Determinação da Dose Letal 50% dos venenos *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus*” estabelece que para que um ensaio seja considerado válido, é necessário que:

- a) o valor da DL<sub>50</sub> do veneno testado deve estar dentro dos limites de confiança ( $p = 0,95$ ) compreendidos entre 50 e 200% do valor nominal do veneno de referência;
- b) os animais utilizados no ensaio devem morrer proporcionalmente à quantidade de veneno presente nas diluições, em pelo menos três diluições consecutivas;
- c) a dose que mata 50% dos animais deve estar no intervalo compreendido entre a maior e a menor diluição do ensaio;
- d) a faixa de resposta (porcentagem de sobrevivência) deve estar compreendida entre 10 e 90% formando a curva de regressão que deve apresentar relação linear, ou seja, desvio de linearidade não significativo ( $p > 0,05$ ).

Obs: a interpretação dos critérios preconizados pela Farmacopéia Brasileira para a aceitação dos ensaios de DL<sub>50</sub> e DE<sub>50</sub> foi estabelecida pelo INCQS, com a colaboração do Dr. Bertrand Poirier estatístico da “Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé – Afssaps”, em 2005, quando visitou o Instituto.

Dos 16 ensaios de DL<sub>50</sub>, realizados nos laboratórios produtores todos foram avaliados pelos critérios de aceitação de ensaios adotados pelo INCQS, cinco ensaios (31,25%) foram considerados como inválidos (**Quadro 13**).

Quadro 13 - Determinação da DL<sub>50</sub> do Veneno Botrópico de Referência BRA/BOT/05, realizada pelo INCQS e pelos laboratórios produtores.

	INCQS	Laboratório 01	Laboratório 02	Laboratório 03
ENSAIO I (µg/0,5 mL)	39,69	INVÁLIDO	43,62	41,57
ENSAIO II (µg/0,5 mL)	42,53	38,49	59,76*	39,01
ENSAIO III (µg/0,5 mL)	40,96	36,78	INVÁLIDO	42,42
ENSAIO IV (µg/0,5 mL)	NR	INVÁLIDO	INVÁLIDO	NR
ENSAIO V (µg/0,5 mL)	NR	INVÁLIDO	38,72	NR
MÉDIA (µg/0,5 mL)	41,06	37,64	47,37	41,00
DESVIO PADRÃO	1,42	1,21	11,01	1,78
CV INTERENSAIO (%)	3,46	3,21	23,24	4,33

\* Resultado considerado aberrante pelo teste de qui-quadrado na planilha de combinação ponderada de resultados (Council of Europe, 2008)

NR - Não realizado

Os principais motivos das invalidações dos ensaios foram:

1. A ausência de linearidade em pelo menos três diluições consecutivas, evidenciada pela inversão dos pontos da curva - quando um maior valor obtido não corresponde ao maior estímulo aplicado – ou quando a curva de regressão apresentou um valor de  $p < 0,05$ .
2. Quando a dose que mata 50% dos animais não se encontra no intervalo compreendido entre a maior e a menor dose. Em muitos dos casos, a dose letal 50% estava exatamente sobre a maior ou a menor dose ou até mesmo fora da curva, o que não é considerado como válido.

Inicialmente o valor médio das determinações de potência do veneno de referência botrópico (DL<sub>50</sub>) foi calculado pelo INCQS, pela planilha eletrônica (WHOPROG, 1997) utilizando todos os ensaios considerados válidos, segundo os critérios adotados pelo INCQS com o objetivo de verificar o impacto das diferentes interpretações dos critérios recomendados pela Farmacopéia Brasileira nas determinações da DL<sub>50</sub>.



O valor médio obtido com os critérios e os ensaios considerados válidos pelo INCQS foi de 42,14 µg/0,5 mL com os valores do Desvio Padrão e do Coeficiente de Variação (DP = 6,20 e CV = 14,71%) (**Quadro 14**).

Quadro 14 - Determinação do valor médio da DL<sub>50</sub> do Veneno Botrópico de Referência BRA/BOT/05 (INCQS).

	INTERLABORATORIAL
DL50 Potência (µg/0,5 mL)	42,14
Desvio Padrão	6,20
CV Interlaboratórios (%)	14,71

Tendo em vista que cada laboratório realizou três determinações da DL<sub>50</sub> independentes (não foram feitos experimentos em duplicatas), não foi possível calcular a precisão intraensaios, porém não comprometeu os objetivos deste estudo.

A precisão interensaios variou entre um CV de 3,21% (Lab 01); 3,46 % (INCQS); 4,33 % (Lab 03) e 23,24% (Lab 02). A precisão interlaboratórios apresentou um CV de 14,71 % (**Quadro 13 e 14**). Estes resultados representam, em termos de ensaios biológicos, um desempenho excelente, considerando-se que um CV de até 20 % para imunoenaios como ELISA é um valor aceitável (van der ARK et al., 2000) e um CV maior de 50 % pode ser obtido em ensaios com o uso de animais e células como substrato (WHO, 1997).

Com o objetivo de eliminar resultados aberrantes no cálculo da potência declarada do lote nº 05 do veneno botrópico de referência – BRA/BOT/05 foram aplicados os testes de Grubbs e de qui-quadrado na planilha de Combinação Ponderada de Ensaios, recomendada pela Farmacopéia Européia (Council of Europe, 2008) onde foi identificado como aberrante o valor de 59,76 µg/0,5 mL obtido pelo laboratório 02. Após a exclusão dos resultados aberrantes pelo teste de Grubbs. Foi obtido o valor médio da DL<sub>50</sub> de **40,05 µg/0,5 mL**, com um limite inferior de 38,92 µg/0,5 mL e limite superior de 41,21 µg/0,5 mL (**Quadro 15**).

Quadro 15 – Determinação da DL<sub>50</sub> do Veneno Botrópico de Referência - combinação de 10 ensaios

DL <sub>50</sub>	LI	LS
39,69	35,87	43,91
42,53	38,3	47,23
40,96	37,01	45,34
38,49	34,59	42,83
36,78	33,09	40,89
43,62	39,37	48,32
38,72	36,56	41
41,57	37,16	46,5
39,01	34,39	44,25
42,42	38,13	47,19

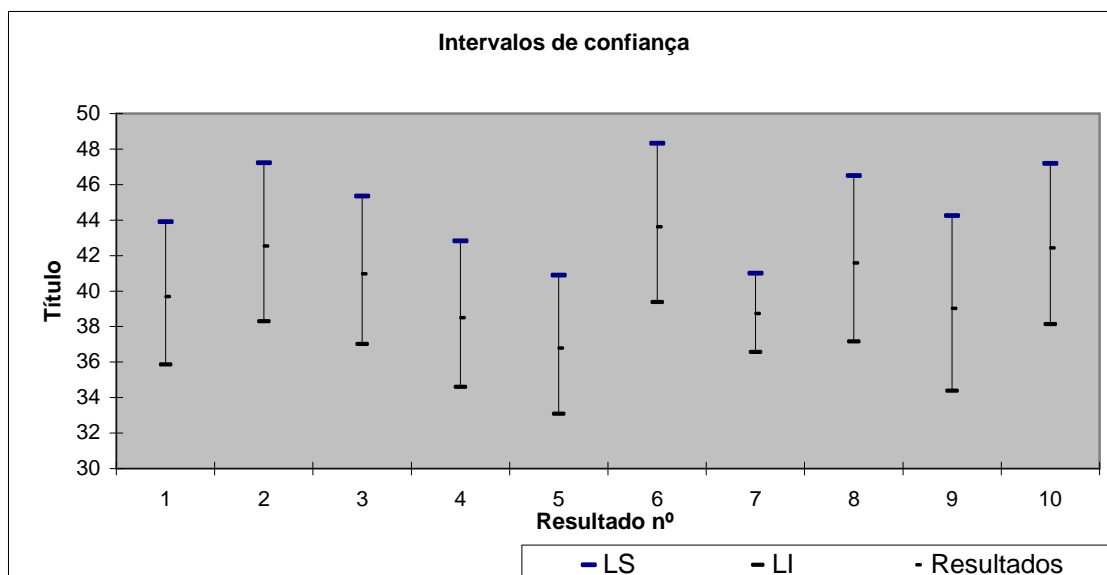
**Teste de Homogeneidade**

X <sup>2</sup> calc	p	X <sup>2</sup> tab
11,570	0,2387	16,919

**Dados homogêneos**

<b>DL<sub>50</sub></b>	40,05	µg/dose
<b>LI</b>	38,92	µg/dose
<b>LS</b>	41,21	µg/dose

Gráfico 4 – Determinação da DL<sub>50</sub> do Veneno Botrópico de Referência - combinação de 10 ensaios.



## B. Determinação da potência do Soro Antibotrópico candidato a Referência Nacional BRA/ANTIBOT/01

Foi solicitado que cada laboratório realizasse três ensaios independentes (repetições em momentos diferentes) da determinação da potência do Soro de Referência BRA/ANTIBOT/01, sendo que cada ensaio em duplicata. Observamos que o laboratório 01 realizou dez ensaios, portanto quatro acima do solicitado.

### LABORATÓRIO: INCQS

Ensaio de potência nº: IA Data: 15/04/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	5
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	2
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	2

**DE<sub>50</sub>** 28,63 µg  
**Potência** 6,69 mg/mL

Ensaio de potência nº: IB Data: 15/04/2008

Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	5
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	1
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	1

**DE<sub>50</sub>** 29,70 µg  
**Potência** 6,44 mg/mL

Ensaio de potência nº: IIA Data: 30/04/2008  
 Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
 Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	1
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	1
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	0

**DE<sub>50</sub> Inválido (p<0,05)**  
**Potência Inválido**

Ensaio de potência nº: IIB Data: 30/04/2008  
 Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
 Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	2
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	2
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	1

**DE<sub>50</sub> Inválido (p<0,05)**  
**Potência Inválido**

Ensaio de potência nº: IIIA Data: 14/05/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	5
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	1
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	1

**DE<sub>50</sub> 29,70 µg**  
**Potência 6,44 mg/mL**

Ensaio de potência nº: IIIB Data: 14/05/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	2
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	7
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	2
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	0

**DE<sub>50</sub> 27,04 µg**  
**Potência 7,08 mg/mL**

**2ª Etapa: Determinação da potência do Soro Antibotrópico candidato a Referência Nacional BRA/ANTIBOT/01**

Ensaio de potência nº: **1** | Data: 11/07/08

Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL

Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	6
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	1
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	0

**DE<sub>50</sub>: 28,82 µg**

**Potência: 6,64 mg/mL**

Ensaio de potência nº: **2** | Data: 10/09/08

Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL

Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	4
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	2
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	2

**DE<sub>50</sub>: 29,52 µg**

**Potência: 6,48 mg/mL**

## LABORATÓRIO: 01

Ensaio de potência nº: IA Data: 08/02/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	6
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	4
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	3

**DE<sub>50</sub> 22,79 µg**  
**Potência 8,40 µg/0,5 mL**

Ensaio de potência nº: IB Data: 08/02/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	7
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	5
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	0
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	0

**DE<sub>50</sub> 32,12 µg**  
**Potência 5,96 µg/0,5 mL**

Ensaio de potência nº: IIA Data: 12/02/2008  
 Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
 Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	4
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	5
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	0
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	0

**DE<sub>50</sub> Inválido**  
**Potência Inválido**

Ensaio de potência nº: IIB Data: 12/02/2008  
 Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
 Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	7
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	2
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	1
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	1

**DE<sub>50</sub> 33,94 µg**  
**Potência 5,64 mg/mL**



Ensaio de potência nº: IIIA Data: 13/02/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	6
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	3
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	2
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	1

**DE<sub>50</sub> 33,10 µg**  
**Potência 5,78 mg/mL**

Ensaio de potência nº: IIIB Data: 13/02/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	5
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	2
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	4

**DE<sub>50</sub> 28,63 µg**  
**Potência 6,69 mg/mL**

Ensaio de potência nº: IA(I) Data: 13/02/2008  
 Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
 Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	7
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	2
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	2
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	3

**DE<sub>50</sub> Inválido**  
**Potência Inválido**

Ensaio de potência nº: IB(I) Data: 13/02/2008  
 Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
 Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	4
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	3
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	2
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	4

**DE<sub>50</sub> Inválido**  
**Potência Inválido**

(I) – ensaios inválidos

Ensaio de potência n°: IA(R) Data: 03/04/2008  
 Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
 Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	10	10
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	10	4
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	10	4
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	10	0

**DE<sub>50</sub> 29,32 µg**  
**Potência 6,53 mg/mL**

Ensaio de potência n°: IB(R) Data: 03/04/2008  
 Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
 Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	6
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	4
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	0
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	0

**DE<sub>50</sub> 34,32 µg**  
**Potência 5,58 mg/mL**

(R) - repetição

## **2ª Etapa: Determinação da potência do Soro Antibotrópico candidato a**

### **Referência Nacional BRA/ANTIBOT/01**

Ensaio de potência nº: **1** | Data: 16/04/08

Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL

Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	7
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	0
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	0
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	1

**DE<sub>50</sub>: Inválido**

**Potência: Inválido**

Ensaio de potência nº: **2** | Data: 25/06/08

Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL

Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	6
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	7
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	1
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	3

**DE<sub>50</sub>: Inválido**

**Potência: Inválido**

Ensaio de potência nº: **3** | Data: 01/07/08

Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL

Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	6
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	4
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	4
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	1

**DE<sub>50</sub>: 38,09 µg**

**Potência: 5,02 mg**

**LABORATÓRIO: 02**

Ensaio de potência nº: IA Data: 02/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	7
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	2
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	2

**DE<sub>50</sub>** 26,97 µg  
**Potência** 7,10 mg/mL

Ensaio de potência nº: IB Data: 02/2008  
Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	6
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	0
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	0

**DE<sub>50</sub>** 30,37 µg  
**Potência** 6,30 mg/mL

Ensaio de potência nº: IIA | Data: 02/2008  
 Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
 Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	7
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	7
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	3
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	2

**DE<sub>50</sub>**      **24,37 µg**  
**Potência**   **7,85 mg/mL**

Ensaio de potência nº: IIB    Data: 02/2008  
 Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
 Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	6
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	2
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	2

**DE<sub>50</sub>**      **27,78 µg**  
**Potência**   **6,89 mg/mL**

Ensaio de potência nº: IIIA Data: 03/2008  
 Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
 Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	8
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	4
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	4

**DE<sub>50</sub> Inválido**  
**Potência Inválido**

Ensaio de potência nº: IIIB Data: 03/2008  
 Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
 Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	5
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	3
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	1

**DE<sub>50</sub> 26,82 µg**  
**Potência 7,14 mg/mL**

**2ª Etapa: Determinação da potência do Soro Antibotrópico candidato a Referência Nacional BRA/ANTIBOT/01**

Ensaio de potência nº: **1** | Data:03/08

Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL

Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	8
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	2
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	8

**DE<sub>50</sub>: Inválido**

**Potência: Inválido**

Ensaio de potência nº: **2** | Data:04/08

Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL

Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	4
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	0
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	2

**DE<sub>50</sub>: 31,80 µg**

**Potência: 6,02 mg/mL**



### LABORATÓRIO 03

Ensaio de potência nº: IA Data: 20/03/2008

Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL

Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	6
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	4
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	3

**DE<sub>50</sub> 22,79 µg**

**Potência 8,40 mg/mL**

Ensaio de potência nº: IB Data: 28/03/2008

Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL

Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	6
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	3
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	1

**DE<sub>50</sub> 25,97 µg**

**Potência 7,40 mg/mL**

Ensaio de potência nº: IIA Data: 28/03/2008  
 Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
 Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	7
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	3
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	1

**DE<sub>50</sub> 25,14 µg**  
**Potência 7,61 mg/mL**

Ensaio de potência nº: IIB Data: 26/03/2008  
 Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
 Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	8
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	6
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	3

**DE<sub>50</sub>:20,44**  
**Potência 9,36 mg/mL**

Ensaio de potência nº: IIIA Data: 20/03/2008  
 Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
 Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	2
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	1
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	0

**DE<sub>50</sub> 32,49 µg**  
**Potência 5,89 mg/mL**

Ensaio de potência nº: IIIB Data: 20/03/2008  
 Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
 Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	3
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	1
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	1

**DE<sub>50</sub> 31,52 µg**  
**Potência 6,00 mg/mL**

**2ª Etapa: Determinação da potência do Soro Antibotrópico candidato a Referência Nacional BRA/ANTIBOT/01**

Ensaio de potência nº: 1 | Data:04/04/08

Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL

Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	7
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	2
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	0
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	4

**DE<sub>50</sub>: 35,15 µg**

**Potência: 5,45 mg/mL**

Ensaio de potência nº: 2 | Data:04/04/08

Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL

Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	8
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	7
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	2
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	1

**DE<sub>50</sub>: 25,91 µg**

**Potência: 7,39 mg/mL**

Na avaliação dos resultados da  $DE_{50}$  e potência do candidato a Soro de Referência, também ficou evidente que cada laboratório interpreta diferentemente as recomendações da Farmacopéia Brasileira, monografia de *Soro Antibotrópico* (BRASIL, 2004). Portanto, todos os experimentos foram avaliados seguindo os critérios de aceitação de ensaios adotados pelo INCQS pelo programa WHOPROG, mesmo procedimento adotado para a determinação da potência do Veneno de Referência.

A Farmacopéia Brasileira preconiza que:

“A faixa de resposta (porcentagem de sobrevivência) deve estar compreendida entre 10% e 90%, formando a curva de regressão que deve apresentar relação linear. Os limites de confiança não devem ser amplos, indicando melhor precisão do ensaio quanto menor forem os seus limites. Expressar o resultado em miligramas de veneno neutralizado por mL de soro”.

O INCQS em seu Procedimento Operacional Padronizado nº 65.3440.004 “Ensaio de Potência para o Soro Antibotrópico – IN VIVO” estabelece que para que um ensaio seja considerado válido, é necessário que:

- a. para o cálculo da  $DE_{50}$  deve-se levar em conta: o limite de confiança ( $p = 0,95$ ) compreendidos entre 50 e 200% da potência estimada;
- b. os animais utilizados no ensaio devem sobreviver proporcionalmente à quantidade de soro presente nas diluições, em pelo menos três diluições consecutivas;
- c. a dose que mata 50% dos animais deve estar no intervalo compreendido entre a maior e a menor diluição do ensaio;
- d. a faixa de resposta (porcentagem de sobrevivência) deve estar compreendida entre 10 e 90% formando a curva de regressão que deve apresentar relação linear ou seja, desvio de linearidade não significativo ( $p > 0,05$ ).

Os resultados obtidos para as titulações do “Soro de Referência” na 2ª etapa do estudo, também foram considerados para efeito dos cálculos do valor médio da potência do candidato BRA/ANTIBOT/01 (**Quadro 16 – Ensaios IV e V**)

Dos 37 ensaios de potência realizados nos laboratórios produtores todos foram avaliados pelos critérios de aceitação de ensaios adotados pelo INCQS, dez ensaios foram considerados como inválidos (**Quadro 16**).

Quadro 16 - Determinação da potência do Soro Antibotrópico de Referência BRA/ANTIBOT/01, realizada pelo INCQS e pelos produtores.

	I a	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb	IV	V
INCQS	6,69	6,44	INV	INV	6,44	7,08	6,64	6,48
Lab 01	8,40*	5,96	INV	5,64	5,78	6,69	INV	INV
	INV	INV	6,53	5,58	NR	NR	5,02*	NR
Lab 02	7,10*	6,30	7,85*	6,89	INV	7,14	INV	6,02*
Lab 03	8,40*	7,40*	7,61*	9,36*	5,89*	6,00	5,45*	7,39*

INV - Ensaio inválido

NR - Não realizado

\* Resultado considerado aberrante pelo teste de qui-quadrado na planilha de combinação ponderada de resultados (Council of Europe, 2008)

Os principais motivos das invalidações dos ensaios foram:

1. Não apresentar as três diluições consecutivas, como os animais sobrevivendo a quantidade de soro presentes nas diluições.
2. Quando a dose que mata 50% dos animais não se encontra no intervalo compreendido entre a maior e a menor dose. Em muitos dos casos, a dose letal 50% estava exatamente sobre a maior ou a menor dose ou até mesmo fora da curva, o que não é considerado como válido.

Inicialmente o valor médio das determinações de potência do soro antibotrópico de referência foi calculado pelo INCQS, pela planilha eletrônica (WHOPROG, 1997) utilizando todos os ensaios considerados válidos, segundo os critérios adotados pelo INCQS com o objetivo de verificar o impacto das diferentes interpretações dos critérios recomendados pela Farmacopéia Brasileira nas determinações da DE<sub>50</sub>.

O valor da potência do soro antibotrópico de referência obtida por cada laboratório com os critérios e os ensaios considerados válidos pelo INCQS foi de 6,63 mg/mL com CV intraensaios de 7,51% (INCQS), 6,15 mg/mL com CV intraensaios de 16,23% (Lab.01), 6,88 mg/mL com CV intraensaios de 11,95% (Lab. 02) e 7,19 mg/mL com CV intraensaios de 12,82% (Lab. 03) (**Quadro 17**).

E o valor médio “interlaboratorial” da potência do soro antibotrópico de referência antibotrópico obtido com os critérios e os ensaios considerados válidos pelo INCQS foi 6,73 mg/mL, com o valor do Desvio Padrão de 1,01 e dos Coeficientes de Variações: CV interensaios de 12,26% e CV interlaboratórios 15,03% (**Quadro 18**).

Quadro 17 - Média dos resultados da potência do Soro Antibotrópico candidato a Referência Nacional BRA/ANTIBOT/01

	INCQS	Laboratório 01	Laboratório 02	Laboratório 03
Potência (mg/mL)	6,63	6,15	6,88	7,19
Desvio Padrão	0,25	1,11	0,66	1,34
CV Intraensaios (%)	7,51	16,23	11,95	12,82
CV Interensaios (%)	3,70	18,04	9,61	18,64

Quadro 18 - Precisão do ensaio de potência do Soro Antibotrópico de Referência

	INTERLABORATORIAL
Potência (mg/mL)	6,73
Desvio Padrão	1,01
CV Interensaios (%)	12,26
CV Interlaboratórios (%)	15,03

A precisão interlaboratórios apresentou um CV de 15,03% (**Quadro 18**). Este resultado representa, em termo de ensaio biológico, um desempenho excelente, considerando-se que um CV de 50% pode ser obtido em ensaios com o uso de animais e células como substrato (WHO, 1997).

Com o objetivo de eliminar resultados aberrantes no cálculo da Potência Declarada do Lote n° 01 do Soro Antibotrópico de Referência – BRA/ANTIBOT/01 foi aplicado o teste de Grubbs na Combinação Ponderada de Ensaios, recomendado pela Farmacopéia Européia (Council of Europe, 2008) onde foram identificados como aberrantes os valores de 8,40 e 5,02 mg/mL para o Laboratório 01, os valores de 7,10; 7,85 e 6,02 mg/mL para o Laboratório 02 e os valores de 8,40; 7,40; 7,61; 9,36; 5,89; 5,45 e 7,39 mg/mL para o Laboratório 03. A homogeneidade dos dados avaliados pelo teste de Grubbs, obteve o valor médio da DE<sub>50</sub> de 29,84 µg/0,5 mL, com um limite inferior de 29,03 µg/0,5 mL e limite superior de 30,67 µg/0,5 mL, que corresponde a uma potência de **6,41 mg/mL**, com limite inferior de 6,24 mg/mL e limite superior de 6,59 mg/mL (**Quadro19**).

Quadro 19 – Determinação das doses efetivas médias (DE<sub>50</sub>) do Soro Antibotrópico de Referência - combinação de 15 ensaios.

DE <sub>50</sub>	LI	LS
28,63	25,31	32,38
29,70	26,76	32,96
29,70	26,76	32,96
27,04	24,51	29,83
28,82	26,16	31,76
29,52	25,99	33,53
32,12	28,77	35,86
33,94	29,71	38,77
33,1	26,25	41,73
28,63	25,31	32,38
34,32	30,19	39,01
30,37	28,13	32,78
27,78	24,75	31,19
26,82	23,23	30,96
31,52	28,24	35,18

**Teste de Homogeneidade**

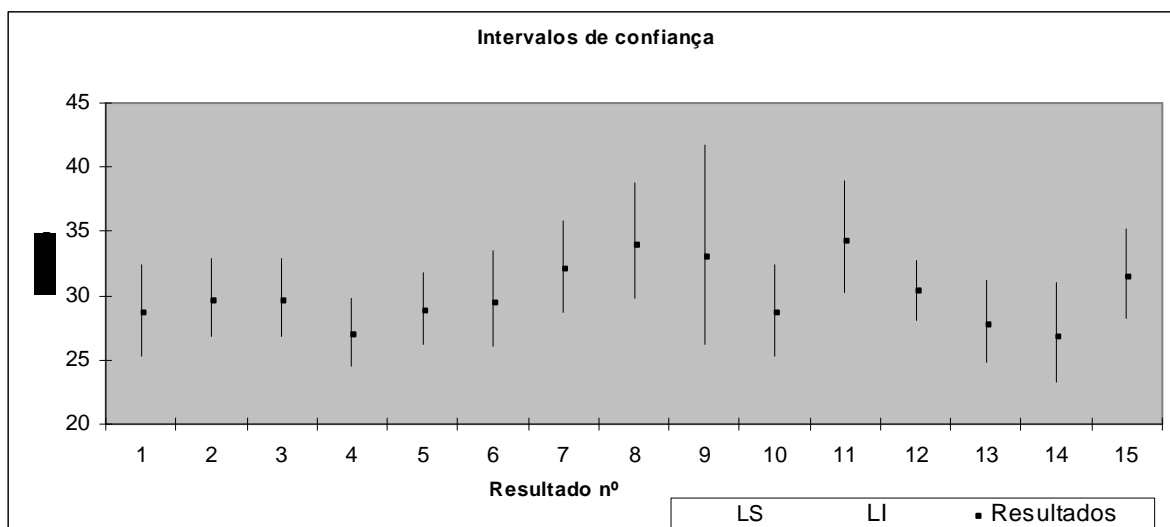
X <sup>2</sup> calc	p	X <sup>2</sup> tab
23,420	0,0538	23,685

**Dados homogêneos**

<b>DE<sub>50</sub></b>	29,84	µg/dose
<b>LI</b>	29,03	µg/dose
<b>LS</b>	30,67	µg/dose

<b>Potência</b>	6,41	mg/mL
<b>LI</b>	6,24	mg/mL
<b>LS</b>	6,59	mg/mL

Gráfico 5 – Determinação das doses efetivas médias (DE<sub>50</sub>) do Soro Antibotrópico de Referência - combinação de 15 ensaios





## 4.2 DISCUSSÃO

O Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS), pertencente à Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ no Rio de Janeiro – RJ, tem como missão contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária. Além de realizar o papel de instituto oficial de controle da qualidade de imunobiológicos, onde são analisados os soros produzidos e utilizados no país.

O Brasil pela sua grande extensão territorial e suas diferenças regionais de desenvolvimento também demonstra situações especiais quanto aos relatos dos acidentes ofídicos e conseqüentemente as providências necessárias e urgentes. Merece destaque a região nordeste que registra o maior coeficiente anual de acidentes ofídicos por regiões fisiográficas, e maior índice de letalidade desse agravo (SINITOX, 2009). Há, portanto a necessidade de maior vigilância quanto aos acidentes ofídicos. Estes índices elevados podem ser pela falta de unidades de saúde equipadas e com pessoal técnico treinados nesta região do país ou também somados os tratamentos empíricos rotineiros nesta área. Situação oposta é encontrada na região sul. Esta apresenta o grande número de notificações de casos de envenenamentos ofídicos no país e a menor taxa de letalidade. Observa-se a necessidade de investimento na preparação de pessoal especializado e maior número de unidades de atendimento para fornecer uma real situação nacional dos acidentes ofídicos.

O desenvolvimento desta área necessita também de pesquisa para melhoria dos antivenenos oferecidos a população e conseqüentemente a padronização de métodos para dosagem de sua eficácia. Sendo o INCQS, referência do Ministério da Saúde nesta área, a partir de 1991 criou-se o Setor de Soros Antipeçonhentos, considerando-se o interesse em projetos de pesquisa de relevância ou programas de monitoramento dos produtos, oferecidos a população, bem como o controle dos mesmos para a saúde pública.

A Unidade da Garantia da Qualidade e Segurança de Biológicos da OMS organizou em fevereiro de 2001 em Londres o “Workshop on the Standardization and Control of Antivenoms”, para discutir o progresso na padronização e controle da qualidade de antivenenos. Recomendou-se o estabelecimento de padrões de referência nacionais ou regionais para o ensaio de potência de modo a permitir a comparação lote a lote, assim como a comparação entre laboratórios.

Sob a responsabilidade do INCQS foi realizada uma reunião em maio de 2002, com todas as entidades relacionadas com a produção, controle e distribuição dos soros antipeçonhentos no Brasil, aonde vimos o interesse pela implantação de melhorias nas metodologias analíticas para o controle da qualidade dos soros antipeçonhentos assim como a necessidade de se produzir novo lote de veneno de referência, e que o título deste veneno fosse estabelecido através de um estudo colaborativo interlaboratorial. Até hoje a potência (em  $DL_{50}$ ) do veneno botrópico (lote 05) foi estabelecido unicamente pelo INCQS o valor de  $47,8 \mu\text{g}/0,5\text{mL}$ , sendo este utilizado por todos os laboratórios produtores.

O trabalho recente de Araújo e cols, (2008) constitui um dos poucos onde é realizada a avaliação de metodologias para determinação da potência do soro antibotrópico no Brasil. Neste é proposto, a metodologia da potência relativa para determinação da potência do soro antibotrópico.

Desta forma esperamos que nossa linha de trabalho possa contribuir para a área de controle da qualidade de soros antiofídicos, área esta tão carente de publicações em nosso país.

Um estudo colaborativo visando determinar a potência do veneno e do soro antibotrópico de referência foi realizado no ano de 2007 e contou com a participação dos produtores nacionais, onde, na realização de uma primeira etapa, foi reavaliada a potência do veneno botrópico e avaliada a potência do soro antibotrópico de referência. Os resultados obtidos mostraram uma homogeneidade e padronização na realização dos ensaios necessários.

De acordo com os critérios de aceitação previamente estabelecidos para este estudo (ANEXO I), que previa que “os materiais de referência (soro e veneno) seriam considerados aptos, caso a precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) apresentasse coeficientes de variação inferiores (CV) a 50 %”, vimos que a potência declarada em  $DL_{50}$  do lote 05 do veneno botrópico de referência deve passar a ser de  $40,0 \mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$ , este valor deverá ser adotado por todos os laboratórios em substituição ao valor de  $47,85 \mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$ , tendo em vista que a precisão interlaboratórios (CV) foi de 14,71 %, resultado considerado excelente. Tendo em vista que um (CV) de até 20 % para imunoenaios como ELISA é um valor aceitável (van der ARK et al., 2000) e um (CV) maior de 50 % pode ser obtido em ensaios com o uso de animais e células como substrato (WHO, 1997).

Coube ao INCQS, órgão da Vigilância Sanitária como função por ser também o organizador deste estudo, o estabelecimento de um soro antibotrópico de referência. Foram utilizadas amostras de soros enviadas e previamente analisadas pelos laboratórios produtores nacionais. Estas amostras constituíram um “pool”, dando origem ao lote de soro antibotrópico candidato a referência, conforme descrito na parte da obtenção do “pool” de soro antibotrópico (3.2.2). Os resultados encontrados de DE<sub>50</sub> foram 27,63 µg/0,5 mL, com um limite inferior de 26,22 µg/0,5 mL, e um limite superior de 29,11 µg/0,5 mL e a sua potência de 6,92 mg/mL, estando este valor dentro do limite aceito pela Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2004). Alíquotas desse pool do soro antibotrópico candidato à referência foram utilizadas no presente estudo interlaboratorial.

Como resultado desse estudo o valor da DE<sub>50</sub> obtida foi de 29,84 µg/0,5 mL, com um limite inferior de 29,03 µg/0,5 mL, e um limite superior de 30,67 µg/0,5 mL, sendo sua potência de 6,41 mg/mL, com um limite inferior de 6,24 mg/mL e limite superior de 6,59 mg/mL (**Quadro19**), o que estaria de acordo com a potência mínima para liberação de lote de soro antibotrópico segundo a Farmacopéia Brasileira é de 5,0 mg/mL. O CV interlaboratorial obtido foi de 15,04 % (**Quadro 18**) menor do que os 50 % - valor aceitável pela OMS - estando apto, para o objetivo proposto.

Todos os experimentos foram avaliados seguindo os critérios de aceitação de ensaios adotados pelo INCQS e calculados pelo programa (WHOPROG, 1997), sendo o mesmo procedimento adotado para a determinação da potência do Veneno de Referência, assim como para a determinação da potência do soro antibotrópico de referência.

Este estudo mostrou além dos resultados significativos, a necessidade da continuidade desta linha com estudos interlaboratorial, desenvolvendo e validando uma metodologia de avaliação da “Potência Relativa” do soro antibotrópico frente a um soro padrão de referência nacional, possivelmente seria a estratégia mais adequada no sentido de se obter resultados mais confiáveis e precisos, em curto e médio prazo.

## 5 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados expostos podemos concluir que:

- ✓ A potência declarada em  $DL_{50}$  do lote nº 05 do Veneno Botrópico de Referência (BRA/BOT/05) passa a ser 40,0  $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$ . Este valor deve ser adotado por todos os laboratórios nos ensaios de potência para liberação de lotes em substituição ao valor anteriormente utilizado.
- ✓ A potência declarada do lote nº 01 do Soro Antibotrópico de Referência (BRA/ANTIBOT/01) é de 6,41 mg/mL. Este valor deve ser adotado por todos os laboratórios nos estudos de avaliação da metodologia da potência relativa para a liberação de lotes do Soro Antibotrópico em substituição a metodologia oficial da potência absoluta.
- ✓ Os ensaios de potência do veneno botrópico (BRA/BOT/05) e do soro antibotrópico (BRA/ANTIBOT/01) revelaram que a precisão obtida foi satisfatória por ser menor de 50%, valor aceito pela OMS.
- ✓ O candidato a Soro Antibotrópico de Referência pelos resultados apresentados, está apto para ser adotado como a Referência Nacional cumprindo, portanto um dos objetivos deste estudo.
- ✓ Há necessidade de revisão da monografia atual de Soro Antibotrópico da Farmacopéia Brasileira, bem como uniformizar as diferentes interpretações dos laboratórios, mostradas neste estudo.

## 6 REFERÊNCIAS

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

ARAÚJO, H.P.; BOURGUIGNON, S.C.; BOLLER, M.A.A.; DIAS, A.A.S.O.; LUCAS, E.P.R.; SANTOS, I.C.; DELGADO, I.F. Potency evaluation of antivenoms in Brazil: The national control laboratory experience between 2000 and 2006. **Toxicon**, v. 51, p. 502-514, 2008.

BJARNASON, J.B. & FOX, J.W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. **J Toxicol Toxin Rev** 1988/1989;7(2):121-209.

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

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

BOURGUIGNON, S.C.; PASE, F.S.; CALHEIRO, E.B.; JULIANO, M.; AGUIAR, A.S.; MELGAREJO, A.R.; GIOVANNI-DE-SIMONI, S. Bothrops moojeni venom peptides containing Bradykinin potentiating peptides sequence. **Protein and Peptide Letter**, v 8, p. 21-26, 2001.

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

BRASIL. Portaria nº 174 de 11 de novembro de 1996. Aprova as normas técnicas de produção e controle de qualidade dos Soros Antiofídicos, Antitóxicos e Antirábico. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília n. 220, p. 23491, 12 nov. 1996 seção 1.

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

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. Ofidismo 1999-2000. Disponível em: [http://www.funasa.gov.br/guia\\_epi/htm/doencas/acidentes\\_peconhentos/ofidismo.htm](http://www.funasa.gov.br/guia_epi/htm/doencas/acidentes_peconhentos/ofidismo.htm) Acesso em: 26 nov 2002.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira. 4ª ed. fasc. 5, parte II. São Paulo: Atheneu, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde, Brasília. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao.pdf>. Acesso em: 12/06/2007.

BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do veneno ofídico: tratamento das mordeduras de cobras. **Revista de Medicina de São Paulo**, v. 13, p. 265-278, 1903.

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

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

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

CENEPI. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, 4ª ed. Brasília, 1998, 523 p.

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

DALMORA, S.L.; VACCARI, S.F.; SAMPEDRO, A.M. et al. Dosagem biológica do antiveneno botrópico. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 54 n. 1, p. 21-30, 1992. (I)

DETERMINAÇÃO da Dose Letal 50 dos Venenos *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* - In Vivo. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009. seção 10. (65.3440.006).

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

ENSAIO de Potencia para o Soro Antibotrópico- *in vivo*. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008. seção 10. (65.3440.004).

FINNEY, D.J., 1971. Probit analysis 3 rd ed: Cambridge University Press. 333 p.

FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente botrópico In: Cardoso, J.L.C. (Coord.) **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 73-86.

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

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

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A<sub>2</sub> Myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-1424, 1995.

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

GUTIÉRREZ, J.M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, (2009), doi: 10.1016/j.toxicon.1009.01.039. In press.

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

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

HAWGOOD, B.J. Doctor Albert Calmette 1863-1933: founder of antivenomous apy and of antituberculous BCG vaccination. **Toxicon**, v. 37, p. 1241-1258, 1999.

INSTITUTO BUTANTAN. Soros e vacinas. In: Série didática, 3. São Paulo, 2006. 44p. p. 13-16.

KAMIGUTI, A.S.; SANO-MARTINS, I. South American snake venoms affecting haemostasis. **Journal of Toxicology**, v. 14, n. 3, p. 359-374, 1995.

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

MELGAREJO, A.R Serpentes Peçonhentas: Principais grupos, identificação, veneno, M acidentes e primeiros socorros. Instituto Vital Brazil, Rio de Janeiro. Disponível em: <[www.ivb.rj.gov.br/palestras/roteiro.doc](http://www.ivb.rj.gov.br/palestras/roteiro.doc)>. Acesso em: 04 nov. 2008.

NAHAS I, Kamiguti A.S, Barros M.A.R. Thrombin-like and factor X-ativador components of *Bothrops* snake venoms. **Thromb and Haemost** 1979;41(2):314-28.

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

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

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

PREVENÇÃO de Acidentes com Animais Peçonhentos. Brasília: FUNDACENTRO, 2001. 48p.

PROCESSO de Fabricação de Soros. FUNED. Disponível em: [http://www.funed.mg.gov.br/animais\\_peconhentos/informacoes\\_uteis/index.php](http://www.funed.mg.gov.br/animais_peconhentos/informacoes_uteis/index.php). Acesso em: 08 abr 2006.

ROSENFELD G. Symptomatology, Pathology and Treatment of Snake Bites, in south América. In: BUCHERLW, BUCKLEY EG, DEULOFEU V, (Eds) Venomous Animals and their Venoms. New York: Academic Press, 1971. p. 345-841.

SBH. 2005. Lista de espécie de répteis do Brasil. Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH). Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.htm>. Acesso em 02/10/2007.

SCHÖTTLER, W.H.A. – Aspectos metodológicos da titulação de soros antipeçonhentos – **Mem. Inst. Butantan** 26: 249-256 (1954).

SILES VILLARROEL, M.S.; ZELANTE, F.; ROLIM ROSA, R.; FURNALETO, R.S. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos em camundongos. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 42/42, p. 311-323, 1978/1979.

SINITOX, Rio de Janeiro, Sistema Nacional de Informações Tóxico – Farmacológicas, Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox>. Acesso em: 12 mar 2009

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

SWAROOP, S.; GRAB, B. Snakebite mortality in the world. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 10, p. 37-76, 1954.

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

TIAN, L. Inferences on the common coefficient of variation. **Statistics in Medicine**, v. 24, p. 14, p. 2213-2220, 2005.

VAN DER ARK, A.; KAPPELLE I.V.S.; ÖLANDER, R.M. et al. The pertussis serological potency test collaborative study to evaluate replacement of the mouse protection test. **Biologicals**, v. 28, p. 105-118, 2000.

WARRELL DA. Snake Venoms in Science and Clinical Medicine. 1.Russell's viper: biology, venom and treatment of bites. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83 (6): 732-40.

WEN, F.H. Soroterapia. In: Cardoso, J.L.C (Coord.) Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003. p.p. 381-393.

WHO. A WHO guide to good manufacturing practices (GMP) requirements, Part 2: Validation. Chp. 15 Validation of analytical assays. p. 65-69. Geneva, 1997.

WHO/VSQ/97.04. Manual of laboratory methods, Part VI: For testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunization. P. 206-208. Geneva, 1997.

WHO. Genebra, World Health Organization. Disponível em: [http://www.who.int/bloodproducts/animal\\_sera/em](http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/em). Acesso em 16 ago 2007.

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



# **ANEXO I**

## **ESTUDO COLABORATIVO:**

**DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA  
DE UM CANDIDATO A SORO AN-  
TIBOTRÓPICO NACIONAL  
BRA/ANTIBOT/01, PARA A AVALI-  
AÇÃO DA METODOLOGIA DA PO-  
TÊNCIA RELATIVA E PARA  
REAVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DO  
LOTE N° 05 DO VENENO BOTRÓ-  
PICO DE REFERÊNCIA BRA/BOT/05**

# ESTUDO COLABORATIVO PARA A DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DE UM CANDIDATO A SORO ANTIBOTRÓPICO DE REFERÊNCIA NACIONAL BRA/ANTIBOT/01, PARA A AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA DA POTÊNCIA RELATIVA E PARA REAVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DO LOTE N° 05 DO VENENO BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA BRA/BOT/05

## I. INTRODUÇÃO:

Com o objetivo de aperfeiçoar a metodologia analítica para a determinação da potência do Soro Antibotrópico e de acordo com as recomendações do “*Workshop on the Standardization and Control of Antivenoms*” realizado em Londres em 2001 e coordenado pela “*Quality Assurance and Safety of Biologicals Unit*” da Organização Mundial de Saúde (Theakston, 2003), que preconiza “... o estabelecimento de venenos e antivenenos de referencia é essencial para a padronização destes ensaios e para permitir a comparação lote a lote, assim como a comparação entre laboratórios. Idealmente a atividade dos antivenenos deve ser expressa em unidade neutralizante de toxina baseada em um padrão nacional ou regional”.

O INCQS se propõe a organizar um estudo colaborativo com o objetivo de:

1. **Avaliar a potência de um candidato a Soro Antibotrópico de Referência Nacional.**

O lote candidato a Soro Antibotrópico de Referência Nacional BRA/ANTIBOT/01, foi produzido no INCQS a partir de um *pool* de 360 frascos provenientes dos seguintes produtores: Centro de Produção de Pesquisa de Imunobiológicos – CPPI; Fundação Ezequiel Dias – FUNED; Instituto Butantan – IB e Instituto Vital Brasil – IVB. Este lote consiste em uma preparação líquida em alíquotas de 3 mL, estocado entre 4 e 8 °C.

2. **Comparar a metodologia de determinação da Potência do Soro Antibotrópico pela determinação da Dose Efetiva 50% (DE<sub>50</sub>) com a metodologia da Potência Relativa.**

Com o objetivo de discutir as questões relacionadas à produção e controle da qualidade dos soros antipeçonhentos produzidos no país o INCQS convocou uma oficina de trabalho nos dias 22 e 23 de maio de 2002, intitulada: Situação atual e perspectivas futuras para a produção e controle de soros antipeçonhentos utilizados no Brasil. Esta reunião contou com a participação das seguintes entidades: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS/FIOCRUZ, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Fundação Nacional de Saúde – FUNASA, Centro de Produção de Pesquisa de Imunobiológicos – CPPI, Fundação Ezequiel Dias – FUNED, Indústria Química do Estado de Goiás – IQUEGO, Instituto de Biologia do Exército – IBEx, Instituto Butantan – IB e Instituto Vital Brasil – IVB. Dentre várias deliberações resultantes da reunião, podemos destacar a disposição de todos os envolvidos em trabalhar conjuntamente na avaliação e implementação de melhorias nas metodologias analíticas para o controle da qualidade destes produtos. Foi ponto consensual que o desenvolvimento e validação de uma metodologia de avaliação da potência relativa do soro antipeçonhento frente a um soro padrão de referência nacional, possivelmente seja a estratégia mais adequada no sentido de se obter resultados mais confiáveis, em curto prazo.

3. **Reavaliar a potência do lote nº 05 do Veneno Botrópico de Referência BRA/BOT/05.**

De acordo com as conclusões e recomendações do estudo colaborativo para o estabelecimento do veneno botrópico de referência nacional realizado em março de 2003 onde foi consenso que: “Tendo em vista os diferentes resultados obtidos pelos Laboratórios participantes, não é possível a determinação de um valor de  $DL_{50}$  para o Lote 05 do Veneno de Referência que represente o comportamento do ensaio nos diferentes Laboratórios nas condições atualmente observadas” e também, **“até que seja possível a titulação do Lote 05 do Veneno Botrópico de Referência através de um Estudo Colaborativo**, os Laboratórios deverão utilizar como referência o valor da  $DL_{50}$  de 47,85  $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$ , obtido pelo INCQS”, propomos a uma reavaliação do título do lote nº 05 do Veneno Botrópico de Referência.

#### **4. Avaliar a aplicabilidade de um controle de veneno.**

Tendo em vista que a metodologia preconizada pela Farmacopéia Brasileira não prevê a realização de controle positivo para a dose de veneno utilizada no desafio, propomos a avaliação da aplicabilidade da introdução de um controle positivo para a dose desafio (5 DL<sub>50</sub>), em paralelo as determinações da potência. Em observações preliminares evidenciamos, com uma certa frequência, que a dose desafio (5 DL<sub>50</sub>) pode não matar 100% dos animais inoculados, o que seguramente interfere significativamente nos resultados obtidos.

Este estudo consistirá em duas etapas, primeiramente será determinada a potência do soro candidato à referência, reavaliado o título do lote nº 05 do Veneno Botrópico de Referência BRA/BOT/05 e avaliada a aplicabilidade de um controle de veneno. Em uma segunda etapa será realizada a comparação entre as metodologias de determinação da potência pela DE<sub>50</sub> e pela Potência Relativa.

## **II. PARTICIPANTES**

Laboratórios brasileiros produtores de Soro Antibotrópico e o INCQS.

## **III. MATERIAL**

**BRA/ANTIBOT/001:** Serão enviados 12 frascos do soro candidato, para a determinação da potência em unidades neutralizantes (UN) e para a comparação entre as metodologias de determinação da potência pela DE<sub>50</sub> e pela Potência Relativa.

**BRA/BOT/005:** Serão enviados 05 frascos de veneno botrópico de referência.

**Amostras codificadas:** Serão enviados 04 frascos de quatro amostras codificadas (de A a D).

## IV. MÉTODO

**1ª Etapa: Avaliação da potência do candidato a Soro Antibotrópico de Referência Nacional BRA/ANTIBOT/01, reavaliação da potência do lote nº 05 do Veneno Botrópico de Referência BRA/BOT/05 e avaliação da aplicabilidade de um controle de veneno.**

Deverão ser realizados três ensaios independentes (repetições em momentos diferentes) das seguintes determinações:

- Determinação da DE<sub>50</sub> do Soro Antibotrópico de Referência Nacional. BRA/ANTIBOT/01. Esta determinação deverá ser feita em duplicata.
- Determinação da DL<sub>50</sub> do Veneno Botrópico de Referência BRA/BOT/05. Esta determinação deverá ser feita em paralelo com a determinação da DE<sub>50</sub>.
- Avaliação da aplicabilidade de um controle de veneno. Paralelamente a cada determinação de potência, deverá ser inoculado com 5 DL<sub>50</sub> um grupo de 10 animais.

**2ª Etapa: Comparação da metodologia de determinação da Potência do Soro Antibotrópico pela determinação da Dose Efetiva 50% (DE<sub>50</sub>) com a metodologia da Potência Relativa.**

As quatro amostras codificadas deverão ser tituladas em dois ensaios independentes (repetições em momentos diferentes) em paralelo com o soro candidato a referência.

Todas as amostras serão analisadas de acordo com a 4ª Edição da Farmacopéia Brasileira, parte II, 2004. As determinações da DL<sub>50</sub> e DE<sub>50</sub> deverão ser realizadas seguindo os procedimentos operacionais padronizados de cada laboratório.

## V. COLETA E ANÁLISE DOS DADOS

O INCQS será responsável pelo recebimento, revisão e codificação dos dados submetidos pelos laboratórios participantes. Um relatório será preparado e distribuído para todos os participantes, para comentários. Os laboratórios serão identificados por um código em todas as análises para manter a confidencialidade dos resultados.

Os materiais de referência (soros e venenos) serão considerados aptos, caso a precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) apresente coeficientes de variação

inferiores a 50% (WHO. 1997. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements, Part 2: Validation. Chp. 15. Validation of analytical assays. p. 65- 69. Geneva).

A metodologia da potência relativa será considerada aplicável, caso a precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) apresente coeficientes de variação do ensaio da potência relativa inferiores aqueles observados para a potência absoluta. A aplicabilidade da implantação da metodologia, caso seja considerada apta, deverá ser definida após uma avaliação de custo benefício.

## **VI. PUBLICAÇÃO DOS RESULTADOS**

O INCQS será responsável pela publicação dos resultados do estudo em revista científica especializada. Serão considerados autores a equipe técnica do INCQS e até dois técnicos de cada laboratório participante, designado pelo investigador principal.

## **VII. CRONOGRAMA**

O estudo seguirá o seguinte cronograma:

- Confirmação da participação no estudo: até 10 de dezembro de 2007.
- Remessa das amostras pelo INCQS: até 15 de dezembro de 2007.
- Envio dos resultados e dados brutos da 1ª etapa: até 15 de março de 2008.
- Envio dos resultados e dados brutos da 2ª etapa: até 15 de abril de 2008.

## **VIII. CORRESPONDÊNCIA**

Correspondência, dados brutos e resultados devem ser encaminhados para:

Maria Aparecida Affonso Boller  
Fundação Oswaldo Cruz  
Departamento de Imunologia  
Laboratório de Vacinas Bacterianas e Soros Hiperimunes  
Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ  
CEP:21045-900  
e-mail: [maria.boller@incqs.fiocruz.br](mailto:maria.boller@incqs.fiocruz.br)  
Tel: (21) 3865-5130 Fax: (21) 2290-0915

**ESTUDO COLABORATIVO:**

**AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DO CANDIDATO A SORO ANTI-  
BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA NACIONAL**

**BRA/ANTIBOT/01**

**REAValiação DA POTÊNCIA DO LOTE Nº 05  
DO VENENO BOTRÓPICO DE REFERBRA/BOT/05**

**AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DE UM CONTROLE DE  
VENENO (5DL<sub>50</sub>)**

**AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA DA POTÊNCIA RELATIVA**

1ª Etapa

**1. Avaliação da potência do candidato a Soro Antibotrópico de Referência Nacional. BRA/ANTIBOT/01.**

Nome do Laboratório	
Ensaio de potência nº: <b>IA</b>	Data: / /

Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL

Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	

DE<sub>50</sub>: \_\_\_\_\_ .

Potência: \_\_\_\_\_ .

Ensaio de potência nº: <b>IB</b>	Data: / /
----------------------------------	-----------

Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL

Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	

DE<sub>50</sub>: \_\_\_\_\_ .

Potência: \_\_\_\_\_ .



### 1ª Etapa:

#### 1. Avaliação da potência do candidato a Soro Antibotrópico de Referência Nacional. BRA/ANTIBOT/01.

Ensaio de potência nº: **IIA** | Data: / /

Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	

DE<sub>50</sub>: \_\_\_\_\_ .

Potência: \_\_\_\_\_ .

Ensaio de potência nº: **IIB** | Data: / /

Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL  
Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	

DE<sub>50</sub>: \_\_\_\_\_ .

Potência: \_\_\_\_\_ .

### 1ª Etapa:

#### 1. Avaliação da potência do candidato a Soro Antibotrópico de Referência Nacional. BRA/ANTIBOT/01.

Ensaio de potência n°: **IIIA** | Data: / /

Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL

Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	

DE<sub>50</sub>: \_\_\_\_\_ .

Potência: \_\_\_\_\_ .

Ensaio de potência n°: **IIIB** | Data: / /

Veneno de referência (BRA/BOT/05): 1 mg/mL

Fator de diluição do soro: 1,3

Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes com 48 horas
1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	
2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	
3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	
4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	

DE<sub>50</sub>: \_\_\_\_\_ .

Potência: \_\_\_\_\_ .

**1ª Etapa:****2. Determinação da DL<sub>50</sub> do Veneno Botrópico de Referência BRA/BOT/05**Ensaio de DL<sub>50</sub> n°: **1**      Data: / /

Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL

Fator de diluição do veneno: 1,2

Diluição	Concentração de Veneno (µg)	Salina (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes em 48 horas
1	62,2	5,26	0,74	10	
2	51,8	5,38	0,62	10	
3	43,2	5,49	0,51	10	
4	36,0	5,57	0,43	10	
5	30,0	5,64	0,36	10	

DL<sub>50</sub>: \_\_\_\_\_ .Ensaio de DL<sub>50</sub> n°: **2**      Data: / /

Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL

Fator de diluição do veneno: 1,2

Diluição	Concentração de Veneno (µg)	Salina (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes em 48 horas
1	62,2	5,26	0,74	10	
2	51,8	5,38	0,62	10	
3	43,2	5,49	0,51	10	
4	36,0	5,57	0,43	10	
5	30,0	5,64	0,36	10	

DL<sub>50</sub>: \_\_\_\_\_ .Ensaio de DL<sub>50</sub> n°: **3**      Data: / /

Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL

Fator de diluição do veneno: 1,2

Diluição	Concentração de Veneno (µg)	Salina (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes em 48 horas
1	62,2	5,26	0,74	10	
2	51,8	5,38	0,62	10	
3	43,2	5,49	0,51	10	
4	36,0	5,57	0,43	10	
5	30,0	5,64	0,36	10	

DL<sub>50</sub>: \_\_\_\_\_ .

### 1ª Etapa:

#### 3. Avaliação da aplicabilidade de um controle de veneno

Experimento n°: 1	Data: / /
-------------------	-----------

Concentração de veneno (1 mg/mL)	Salina (mL)	Veneno 1 mg/mL (mL)	N° de animais	N° de sobreviventes em 48 horas
5 DL <sub>50</sub>	3,2	2,8	10	

Experimento n°: 2	Data: / /
-------------------	-----------

Concentração de veneno (1 mg/mL)	Salina (mL)	Veneno 1 mg/mL (mL)	N° de animais	N° de sobreviventes em 48 horas
5 DL <sub>50</sub>	3,2	2,8	10	

Experimento n°: 3	Data: / /
-------------------	-----------

Concentração de veneno (1 mg/mL)	Salina (mL)	Veneno 1 mg/mL (mL)	N° de animais	N° de sobreviventes em 48 horas
5 DL <sub>50</sub>	3,2	2,8	10	

2ª Etapa: Comparação da metodologia de determinação da Potência do Soro Antitropical pela determinação da Dose Efetiva 50% (DE<sub>50</sub>) com a metodologia da Potência Relativa.

Ensaio de potência nº: <b>1</b>	Data: / /
---------------------------------	-----------

Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL

Fator de diluição do soro: 1,3

Amostra	Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animas	Nº de sobreviventes em 48 horas
<b>Soro de Referência</b>	1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	
	2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	
	3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	
	4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	

DE<sub>50</sub>: \_\_\_\_\_ .

Potência: \_\_\_\_\_ .

Amostra	Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animas	Nº de sobreviventes em 48 horas
<b>Soro A</b>	1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	
	2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	
	3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	
	4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	

DE<sub>50</sub>: \_\_\_\_\_ .

Potência: \_\_\_\_\_ .

Amostra	Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animas	Nº de sobreviventes em 48 horas
<b>Soro B</b>	1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	
	2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	
	3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	
	4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	

DE<sub>50</sub>: \_\_\_\_\_ .

Potência: \_\_\_\_\_ .

Amostra	Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animas	Nº de sobreviventes em 48 horas
<b>Soro C</b>	1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	
	2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	
	3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	
	4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	

DE<sub>50</sub>: \_\_\_\_\_ .

Potência: \_\_\_\_\_ .

Amostra	Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animas	Nº de sobreviventes em 48 horas
<b>Soro D</b>	1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	
	2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	
	3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	
	4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	

DE<sub>50</sub>: \_\_\_\_\_ .

Potência: \_\_\_\_\_ .

### **Avaliação da aplicabilidade de um controle de veneno**

Experimento nº: 1	Data: / /
-------------------	-----------

Concentração de veneno (1 mg/mL)	Salina (mL)	Veneno 1 mg/mL (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes em 48 horas
5 DL <sub>50</sub>	3,2	2,8	10	

Ensaio de potência nº: 2	Data: / /
--------------------------	-----------

Veneno de referência (BRA/BOT/05) – 1 mg/mL

Fator de diluição do soro: 1,3

Amostra	Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animas	Nº de sobreviventes em 48 horas
<b>Soro de Referência</b>	1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	
	2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	
	3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	
	4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	

DE<sub>50</sub>: \_\_\_\_\_ .

Potência: \_\_\_\_\_ .

Amostra	Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animas	Nº de sobreviventes em 48 horas
<b>Soro A</b>	1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	
	2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	
	3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	
	4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	

DE<sub>50</sub>: \_\_\_\_\_ .

Potência: \_\_\_\_\_ .

Amostra	Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animas	Nº de sobreviventes em 48 horas
<b>Soro B</b>	1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	
	2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	
	3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	
	4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	

DE<sub>50</sub>: \_\_\_\_\_ .

Potência: \_\_\_\_\_ .

Amostra	Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animas	Nº de sobreviventes em 48 horas
<b>Soro C</b>	1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	
	2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	
	3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	
	4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	

DE<sub>50</sub>: \_\_\_\_\_ .

Potência: \_\_\_\_\_ .

Amostra	Diluição	Título do Soro	Soro/Animal (µg)	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animas	Nº de sobreviventes em 48 horas
<b>Soro D</b>	1	4,61	41,4	2,70	0,50	2,8	8	
	2	6,00	31,8	2,82	0,38	2,8	8	
	3	7,80	24,5	2,91	0,29	2,8	8	
	4	10,14	18,8	2,98	0,22	2,8	8	

DE<sub>50</sub>: \_\_\_\_\_ .

Potência: \_\_\_\_\_ .

### **Avaliação da aplicabilidade de um controle de veneno**

Experimento nº: 2	Data: / /
-------------------	-----------

Concentração de veneno (1 mg/mL)	Salina (mL)	Veneno 1 mg/mL (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes em 48 horas
5 DL <sub>50</sub>	3,2	2,8	10	