

REGINA MARIA MOURÃO FUCHES

**VALIDAÇÃO DE BIOENSAIOS PARA O ESTUDO DA
IMUNOGENICIDADE DA VACINA CONTRA RAIVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo

2010

REGINA MARIA MOURÃO FUCHES

**VALIDAÇÃO DE BIOENSAIOS PARA O ESTUDO DA
IMUNOGENICIDADE DA VACINA CONTRA RAIVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Osvaldo Augusto Sant'Anna

São Paulo

2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Mourão Fuches, Regina Maria.

Validação de bioensaios para o estudo da imunogenicidade da vacina contra raiva / Regina Maria Mourão Fuches. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant'Anna.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de vacinas.

Versão do título para o inglês: Validation of bioassays to immunogenicity assesment of the anti-rabies vaccines.

Descritores: 1. Vacina contra raiva 2. Validação 3. Bioensaios 4. Imunogenicidade 5. Esquemas de imunização 6. Sílica nanoestruturada SBA-15 I. Sant'Anna, Osvaldo Augusto Brazil Esteves II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB059/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Regina Maria Mourão Fuches.

Título da Tese: Validação de bioensaios para o estudo da imunogenicidade da vacina contra raiva.

Orientador(a): Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant'Anna.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



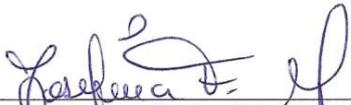
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
INSTITUTO BUTANTAN
SERVIÇO DE CONTROLE DE QUALIDADE



DECLARAÇÃO

Declaro que os 35 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c utilizados no "Estudo da imunogenicidade da vacina contra raiva com diferentes esquemas de imunização" pertenciam à cota de camundongos fornecidos pelo Biotério Central à Seção de Controle Biológico do Instituto Butantan para testes de controle de qualidade de soros e vacinas.

São Paulo, 17 de setembro de 2009



Josefina Farina Morais
Chefe da Seção
Controle Biológico

Ao meu marido Valter e aos
meus filhos, Felipe, Flávia e Patrícia
amores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos Neuza Maria Frazatti Gallina e Marco Antônio Stephano, pelo incentivo para realizar esse projeto. Ao Marco Antônio agradeço também pela orientação nas análises estatísticas, o que fez com enorme boa vontade e dedicação.

Ao Dr. Osvaldo Augusto Sant'Anna, pelo carinho e dedicação com que me orientou nessa jornada, tendo me apoiado mesmo quando passei por momentos difíceis, acreditando no meu trabalho.

À Josefina Farina Morais, pelo apoio e colaboração, possibilitando a realização desse projeto na Seção de Controle Biológico do Instituto Butantan.

À Ana Dulce Arruda dos Santos, pela ajuda na realização dos testes e, principalmente, por estar sempre disposta a colaborar e participar de todos os trabalhos, com dedicação e amizade.

Aos colegas Adriana de Souza Brites, Izilda Aparecida Francisco e Felipe de Oliveira, pelas células fornecidas para a realização dos testes, e pelos inúmeros auxílios fornecidos durante a execução dos mesmos.

A todos os colegas da Seção de Controle Biológico, em especial à Maria de Fátima dos Santos e à Izilda Alves Barrionuovo Aliaga, pelo carinho com que prepararam todo o material utilizado nesse trabalho.

À Patrícia Mathias Guglielmi, Andréia Cristina de Souza, Márcia de Moraes e Cláudia Villano do Carmo, pela amizade, convívio e estímulo.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada por tudo!

“Feliz aquele que transfere o que sabe
e que aprende o que ensina.”

Cora Coralina

RESUMO

Mourão-Fuches RM. Validação de bioensaios para o estudo da imunogenicidade da vacina contra raiva [tese(Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Para atestar a imunogenicidade de vacinas contra raiva, os testes de titulação e de soroneutralização de vírus rábico em células BHK-21 foram validados, com os seguintes resultados: [a] linearidade: $r = 0,99$ e $1,0$; [b] precisão intra-ensaio: CV = 3,4 e 6,3%; [c] precisão inter-ensaios: CV = 4,7 e 5,5%; [d] estabilidade ao congelar e descongelar amostras: CV = 3,5 e 11,7%; [e] estabilidade - tempo entre o descongelamento e realização do teste: CV = 1%; [f] exatidão > 96% e > 87% para ambos os testes. Cinco esquemas de imunização com diferentes concentrações, vias de inoculação e intervalos entre doses foram avaliados em camundongos BALB/c com a vacina contra raiva produzida em células Vero no Instituto Butantan. Foram administrados: Grupo I [preconizado pela OMS] três doses de vacina por via intraperitoneal [IP] nos dias 0, 7 e 28; Grupo II, duas doses IP nos dias 0 e 60; Grupo III, duas doses IP, sendo a 1ª diluída a 1/10 no dia 0 e a 2ª na concentração corrente, no dia 60; Grupo IV, duas doses, sendo a 1ª por via oral [VO] no dia 0 e a 2ª IP no dia 60; Grupo V, duas doses, a 1ª VO com a vacina adsorvida/encapsulada em sílica nanoestruturada SBA-15 e a 2ª IP 60 dias após. Todos os animais imunizados com os esquemas I, II ou III apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes [ACN] $\geq 0,5$ UI/mL, embora os esquemas II e III tenham induzido níveis máximos mais elevados [médias de 41,6 e 39,2 UI/mL] do que os 19,4 UI/mL no Grupo I. A imunização primária com concentrações menores de antígeno leva à indução de resposta eficaz. Nenhum camundongo do grupo IV apresentou ACN, indicando supressão e todos os do grupo V apresentaram títulos de ACN, indicando que a SBA-15 previne a degradação do antígeno no trato gastrointestinal. Esses resultados evidenciam a importância de se analisar o potencial de vacinas revisando esquemas preconizados e testando novos, reduzindo concentrações, empregando outros adjuvantes, avaliando o espaçamento entre doses e vias de inoculação.

Palavras-chave: Vacina contra raiva. Validação. Bioensaios. Imunogenicidade. Esquemas de imunização. Sílica nanoestruturada SBA-15.

ABSTRACT

Mourão-Fuches RM. Validation of bioassays to immunogenicity assessment of the anti-rabies vaccines [Ph. D. Thesis (Biotechnology)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

To assure the reliability of the results of immunogenicity of rabies vaccines, tests of virus titration and neutralization in BHK-21 cells were validated, with the following results: [a] linearity: $r = 0,99$ and $1,0$; [b] repeatability, $CV = 3,4$ and $6,3\%$; [c] precision, $CV = 4,7$ and $5,5\%$; [d] freeze-thaw stability, $CV = 3,5$ and $11,7\%$; [e] front-to-back test, $CV = 1\%$ and [f] accuracy = $> 96\%$ and $> 87\%$ for both tests. Five schemes of immunization with different concentrations, routes of inoculation and interval between doses were evaluated in BALB/c mice with rabies vaccine in Vero cells produced at Instituto Butantan. In Group I, as the protocol recommended by WHO, mice were immunized with three doses of vaccine by intraperitoneal route [IP] on days 0, 7 and 28; in Group II, two doses IP on days 0 and 60; in Group III, two doses IP, the 1st diluted to 1/10 on day 0 and the 2nd at the current concentration, on day 60; in Group IV, two doses, the 1st by oral route on day 0 and the 2nd IP on day 60; and in Group V, two doses, the 1st orally with vaccine adsorbed/encapsulated in nanostructured SBA-15 silica and the 2nd IP, on day 60. All animals immunized with schemes I, II or III presented satisfactory neutralizing antibodies [NAs] titres [$\geq 0,5$ IU/mL], although protocols II and III have reached higher levels of NAs [41,6 e 39,2 IU/mL] than protocol I [19,4 IU/mL]. The results of Groups II and III show that the application of smaller concentrations of antigen induces efficient response and memory. None mouse of Group IV presented NAs, even after a 2nd IP dose, indicating suppression. The administration of vaccine adsorbed/encapsulated in SBA-15 silica may prevent the antigen degradation in the gastrointestinal tract, since all mice presented NAs titers [0,3 – 1,4 IU/mL]. These results confirm the importance of analyze the vaccine's potential reviewing recommended schemes and testing new ones, reducing concentrations, using new adjuvants, evaluating the enlargement of the doses and inoculation routes.

Keywords: Rabies vaccine. Validation. Bioassays. Immunogenicity. Immunizing schemes. Nanostructured SBA-15 silica.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Parâmetros de desempenho relevantes para validar diferentes tipos de procedimentos analíticos.....	20
Quadro 2 - Filogrupos e espécies do vírus rábico.....	24
Quadro 3 - Esquemas de imunização anti-rábica humana para pós-exposição.....	30
Figura 1 - Esquema do teste de CIT para titulação do vírus rábico.....	35
Quadro 4 - Diluições de suspensão de vírus rábico utilizadas para análise de linearidade e exatidão em testes de CIT.....	36
Quadro 5 - Diluições de suspensão de vírus rábico utilizadas para análise de precisão em testes de CIT.....	37
Figura 2 - Esquema do teste de SN em células BHK-21 para dosagem de ACN.....	40
Quadro 6 - Diluições de soro anti-rábico utilizadas para análise de linearidade e exatidão em testes de SN.....	41
Quadro 7 - Diluições de soro anti-rábico utilizadas para análise de repetibilidade em testes de SN.....	42
Quadro 8 - Esquemas de imunização anti-rábica em camundongos, com diferentes vias de inoculação, intervalos entre as doses e concentrações de antígeno.....	45
Figura 3 - Dispersão mostrando a correlação entre os títulos virais [\log_{10} DFF ₅₀ /50 μ L] esperados e médias obtidas em testes de CIT.....	47
Quadro 9 - Resultados obtidos nos ensaios de validação do teste de Titulação do Vírus Rábico [CIT].....	54
Figura 4 - Dispersão mostrando a correlação entre os títulos de ACN [UI/mL] esperados e médias obtidas em testes de SN em células BHK-21.....	55
Quadro 10 - Resultados obtidos nos ensaios de validação do teste de SN do vírus rábico em Células BHK-21.....	61
Figura 5 - Médias dos títulos de ACN de camundongos imunizados com vacina contra raiva por via intraperitoneal.....	62
Figura 6 - Cinéticas da produção de ACN de camundongos imunizados com diferentes concentrações de vacina contra raiva.....	64

Quadro 11 - Taxas de soroconversão [%] dos camundongos submetidos a três esquemas de imunização contra raiva.....	64
Figura 7 - Títulos de ACN de camundongos imunizados por VO com vacina contra raiva adsorvida a SBA-15.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coeficientes da regressão linear das curvas de calibração para o teste de Titulação de vírus rábico em células BHK-21 [CIT].....	48
Tabela 2 - Títulos de vírus rábico [\log_{10} DFF ₅₀ /50 μ L] determinados pelo método de CIT e coeficientes de variação calculados para análise de linearidade do teste	48
Tabela 3 - Títulos de vírus rábico [\log_{10} DFF ₅₀ /50 μ L] determinados pelo método de CIT e % de recuperação obtidas para análise da exatidão do teste.....	49
Tabela 4 - Títulos de vírus rábico [\log_{10} DFF ₅₀ /50 μ L] determinados pelo método de CIT para avaliação da repetibilidade do teste.....	50
Tabela 5 - Títulos de vírus rábico [\log_{10} DFF ₅₀ /50 μ L] determinados pelo método de CIT para avaliação da precisão intermediária do teste.....	51
Tabela 6 - Títulos de vírus rábico [\log_{10} DFF ₅₀ /50 μ L] determinados pelo método de CIT para avaliação da precisão intermediária do teste - Dados normalizados...	51
Tabela 7 - Títulos de vírus rábico [\log_{10} DFF ₅₀ /50 μ L] de amostras dosadas por CIT após intervalos variáveis entre o descongelamento e a execução do teste.....	52
Tabela 8 - Títulos de vírus rábico [\log_{10} DFF ₅₀ /50 μ L] de amostras dosadas por CIT após múltiplos processos de congelamento e descongelamento.....	53
Tabela 9 - Coeficientes da regressão linear das curvas de calibração para o teste de SN em células BHK-21.....	56
Tabela 10 - Títulos de ACN [UI/mL] de um lote de soro equino hiperimune [F(ab') ₂] determinados pelo método de SN em células BHK-21 e coeficientes de variação calculados para análise de linearidade do teste.....	56
Tabela 11 - Títulos de ACN [UI/mL] determinados pelo método de SN em células BHK-21 e % de recuperação calculadas para análise da exatidão do teste.....	57
Tabela 12 - Dosagens do soro referência internacional [UI/mL] em ensaios de SN em células BHK-21 para avaliação da repetibilidade do teste.....	58
Tabela 13 - Dosagens do soro referência internacional [em DE ₅₀] obtidas em ensaios de SN em células BHK-21 com dois operadores.....	59
Tabela 14 - Dosagens do soro referência internacional [em DE ₅₀] obtidas em ensaios de SN em células BHK-21 por um único operador em dias diferentes.....	59
Tabela 15 - Dosagens do soro referência internacional [em DE ₅₀] em ensaios de SN em células BHK-21 após vários processos de congelamento e descongelamento do mesmo.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN - Anticorpos Neutralizantes

ANOVA - Análise de Variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHK - *Baby Hamster Kidney* [Linhagem de células de rim de hamster]

CIT - *Cell Infection Titration*

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CMD - Concentração Média Determinada

CVS - *Challenge Virus Standard*

DE₅₀ - Dose Eficaz 50%

DFF₅₀ - Dose Formadora de Focos Fluorescentes 50%

Eagle-MEM - *Eagle Minimun Essential Medium*

ERA - *Ellen-Rokitnic-Abelseth* [Vacina anti-rábica atenuada em células de rim de porco]

FIMT - *Fluorescence Inhibition Microtest*

GMP - *Good Manufacturing Practice*

H_{III} e H_{IV} - Linhagens de camundongos bons respondedores

HDCV - *Human Diploid Cell Vaccine*

ID - Intradérmica

IgG - Imunoglobulina G

IM - Intramuscular

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IP - Intraperitoneal

L_{III} e L_{IV} - Linhagens de camundongos maus respondedores

NIBSC - *National Institute of Biological Standardization and Control*

NIH - *National Institutes of Health*

NOD - *Nucleotide-binding oligomerization domain*

ODN - Oligodeoxinucleotídeo

PBS - *Phosphate Buffer Solution*

PCEC - *Purified Chick-Embryo Cell Vaccine*

PDEV - *Purified Duck Embryo Vaccine*

PHKC - *Primary Hamster Kidney Cell Vaccine*

PV - *Pasteur Virus*

PVRV - *Purified Vero Cell Rabies Vaccine*
RIG - *Rabies Immunoglobulins*
RFFIT - *Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test*
RNA - *Ribonucleic acid*
RVA - *Rhesus Vaccine Adsorbed*
SBA-15 - *Santa Barbara Amorphous-15* [sílica nanoestruturada mesoporosa]
SBV - Soroalbumina Bovina
SC - Soroconversão
SFB - Soro Fetal Bovino
SN - Soroneutralização
TLR - *Toll-like receptor*
UI - Unidades Internacionais
Vero - Linhagem celular de rim de macaco verde da África ["Vervet"]
Vero-IB - Vacina contra raiva em células Vero desenvolvida no Instituto Butantan
VO - Via Oral
VRC - Vírus Rábico Controle
V-RG - *Vaccinia Rabies Glycoprotein*
WHO - *World Health Organization*
WI-38 - *Wistar Institute* [Linhagem de células diplóides humanas]
3 Rs - *Replacement, Reduction and Refinement*
 \bar{X} = X – média
DP - Desvio Padrão
CV - Coeficiente de Variação
r - Coeficiente de correlação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Validação de bioensaios.....	18
1.2 Titulação de vírus rábico em células BHK-21 [CIT].....	21
1.3 Soroneutralização [SN] de vírus rábico em células BHK-21.....	22
1.4 Vacina contra raiva.....	23
1.5 Avaliação de imunogenicidade de vacinas.....	28
1.6 Esquemas de imunização anti-rábica.....	29
1.7 Sílicas mesoporosas altamente ordenadas.....	31
2 OBJETIVOS.....	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 <i>Validação do teste de Titulação de vírus rábico em células BHK-21 [CIT].</i>	34
3.1.1 Suspensão de vírus.....	34
3.1.2 Células BHK-21.....	34
3.1.3 Realização do teste.....	34
3.1.4 Parâmetros de validação de cada teste realizado.....	36
3.1.5 Parâmetros analisados para validação do método.....	36
3.1.5.1 Linearidade e Exatidão.....	36
3.1.5.2 Precisão.....	37
3.1.5.3 Robustez.....	38
3.1.5.3.1 Influência do tempo entre a descongelação da amostra e a execução do teste.....	38
3.1.5.3.2 Estabilidade ao congelar e descongelar amostras.....	38
3.2 <i>Validação do teste de Soroneutralização [SN] de vírus rábico em células BHK-21.....</i>	39
3.2.1 Reagentes utilizados.....	39
3.2.2 Realização do teste.....	39
3.2.3 Parâmetros de validação de cada teste realizado.....	41
3.2.4 Parâmetros analisados para validação do método.....	41
3.2.4.1 Linearidade e Exatidão.....	41
3.2.4.2 Precisão intra-ensaio.....	42
3.2.4.3 Precisão inter-ensaios [intermediária].....	43
3.2.4.4 Estabilidade ao congelar e descongelar amostras.....	43

3.3 Estudo da imunogenicidade da vacina contra raiva com diferentes esquemas de imunização.....	43
3.3.1 Animais.....	43
3.3.2 Vacina contra raiva.....	44
3.3.3 Sílica mesoporosa nanoestruturada.....	44
3.3.4 Esquemas de imunização.....	44
3.3.5 Obtenção dos soros imunes.....	45
3.3.6 Determinação dos títulos de anticorpos neutralizantes.....	45
3.4 Análise estatística.....	46
4 RESULTADOS.....	47
4.1 Validação do teste de Titulação de vírus rábico em células BHK-21[CIT]..	47
4.1.1 Linearidade.....	47
4.1.1.1 Coeficiente de correlação [r].....	47
4.1.1.2 Coeficiente de variação [CV].....	48
4.1.2 Exatidão.....	49
4.1.3 Precisão intra-ensaio [repetibilidade].....	50
4.1.4 Precisão inter-ensaios [intermediária].....	51
4.1.5 Influência do tempo entre a descongelação da amostra e a execução do teste.....	52
4.1.6 Estabilidade ao congelar e descongelar amostras.....	53
4.1.7 Resumo dos resultados.....	54
4.2 Validação do teste de Soroneutralização de vírus rábico em células BHK-21 [SN em células BHK-21].....	55
4.2.1 Linearidade.....	55
4.2.1.1 Coeficiente de correlação [r].....	55
4.2.1.2 Coeficiente de variação [CV].....	56
4.2.2 Exatidão.....	57
4.2.3 Precisão intra-ensaio [repetibilidade].....	57
4.2.4 Precisão inter-ensaios [intermediária].....	58
4.2.5 Estabilidade ao congelar e descongelar amostras.....	60
4.2.6 Resumo dos resultados.....	61
4.3 Estudo da imunogenicidade da vacina contra raiva com diferentes esquemas de imunização.....	62

4.3.1 Análise da produção de anticorpos neutralizantes [ACN] em camundongos submetidos a três esquemas de imunização por via intraperitoneal [IP].....	62
4.3.1.1 Efeito do número de doses de vacina e do intervalo entre as mesmas na produção de ACN.....	63
4.3.1.2 Efeito da concentração vacinal na produção de ACN.....	63
4.3.2 Análise da produção de ACN em camundongos submetidos a dois esquemas de imunização por via oral.....	65
5 DISCUSSÃO.....	66
6 CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

O impacto dos fatores ambientais sobre as variabilidades genéticas individuais, associado aos fenômenos imunes em populações humanas e em outras espécies animais fornece uma gama de aspectos desconhecidos e significativos sobre as relações adaptativas de hospedeiros e microrganismos e, na quase totalidade das populações de mamíferos, observa-se distribuições contínuas de fenótipos de resistência natural ou adquirida a diferentes infecções. O vírus da raiva talvez seja um dos melhores exemplos de adaptação de um agente ao hospedeiro e ao ambiente, com uma história natural documentada de há muito, tendo sido descrita a.C. Sua distribuição é mundial e atinge 55.000 mortes anuais (World Health Organization, 2008), quase todas em países subdesenvolvidos. Mais de 130 anos após o desenvolvimento da vacina anti-rábica por Louis Pasteur, a humanidade ainda se depara com a raiva, sob a forma epidêmica em algumas regiões. A razão mais importante para que este fato ocorra é a multiplicidade de reservatórios, domésticos ou silvestres. Mais recentemente, com o controle da raiva nos países desenvolvidos, os morcegos, que representam cerca de 25% dos espécimes de mamíferos, se tornaram os mais importantes reservatórios e transmissores... E a raiva humana permanece como um grave problema de saúde pública.

1.1 Validação de bioensaios

Nos últimos anos o desenvolvimento de novos imunobiológicos como vacinas e soros terapêuticos permitiu um grande avanço na medicina, tanto humana quanto veterinária, em relação à prevenção e ao tratamento de doenças transmissíveis. Com o passar do tempo esses produtos têm sido aperfeiçoados com o objetivo de se obter maior eficácia e segurança e, paralelamente, aumentaram as exigências para o controle de qualidade dos mesmos, tendo como consequência a evolução nos testes utilizados para esse fim. Alguns ensaios são imprescindíveis para o controle de qualidade da maioria dos imunobiológicos, como testes de identidade, potência e inocuidade, além dos testes microbiológicos e físico-químicos.

Os testes biológicos, em particular, podem apresentar resultados extremamente variáveis devido à sua natureza. Durante muitos anos essa

variabilidade foi admitida e inclusive, utilizada para justificar resultados imprevistos. Atualmente um grande número de métodos tem sido desenvolvido para o controle de qualidade de imunobiológicos. Vários deles têm como objetivo substituir ou reduzir o número de animais de laboratório utilizados, ou reduzir o sofrimento a eles infligido [conceito dos 3Rs de Russel e Burch: “replacement, reduction and refinement”] (Bruckner et al., 2003; Farnaud, 2009; Hendriksen, 1999). Há um consenso de que esses novos métodos devem ser validados, atestando a confiabilidade dos resultados obtidos e comprovando que são adequados para substituir os testes em animais utilizados até então (Darling, Boose e Spaltro, 1998; Klein et al., 1999).

A palavra validação vem do latim *valere*, que significa ter o poder. Segundo a Conferência Internacional de Harmonização (2005), organizada pelas agências regulatórias dos Estados Unidos [*Food and Drug Agency*], Japão [*Ministry of Health, Labour and Welfare*] e União Européia [*European Medicine Agency*], o objetivo da validação de um procedimento analítico é demonstrar que o mesmo é adequado para uma determinada finalidade. Vários parâmetros são analisados num processo de validação de testes como exatidão, precisão, reprodutibilidade, linearidade, especificidade, limites de quantificação e detecção, podendo-se optar, ainda, por realizar o teste de robustez.

Esses termos são definidos por Darling, Boose e Spaltro (1998) como:

- Exatidão: grau de conformidade entre o valor de referência conhecido do padrão e o valor encontrado durante os estudos de validação.
- Precisão: grau de conformidade entre os valores obtidos no ensaio. Podem ser medidas: precisão intra-ensaio ou repetibilidade; precisão inter-ensaio ou intermediária e reprodutibilidade.
- Precisão intra-ensaio [repetibilidade]: grau de precisão da análise sob as mesmas condições de operação em um curto período de tempo calculado pela análise de dados coletados no mesmo dia.
- Precisão inter-ensaios [intermediária]: grau de precisão de múltiplas determinações de uma amostra em dias diferentes, com operadores diferentes, mas no mesmo laboratório.
- Reprodutibilidade: capacidade de um teste de produzir resultados semelhantes em laboratórios distintos.

- Linearidade: capacidade de um teste de promover leituras diretamente proporcionais à quantidade do princípio que está sendo dosado em uma determinada faixa de resultados.
- Especificidade: capacidade de um teste de medir o elemento analisado em uma amostra na presença de outros componentes que se espera que estejam presentes no produto.
- Limite de detecção: concentração do elemento analisado que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado como um valor exato.
- Limite de quantificação: menor concentração do elemento analisado que pode ser determinado com precisão.
- Robustez: capacidade de um teste de não ser afetado por pequenas, mas deliberadas variações nos parâmetros utilizados no método e indica a confiança da análise durante o uso normal.

É importante ressaltar que todos os equipamentos e instrumentos utilizados na validação devem estar calibrados e os operadores treinados e qualificados. Devem-se utilizar padrões oficializados pela farmacopéia brasileira ou outros códigos autorizados pela legislação vigente (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003).

O quadro a seguir indica os tipos de parâmetros que precisam ser validados para diferentes tipos de testes.

Quadro 1 - Parâmetros de desempenho relevantes para validar diferentes tipos de procedimentos analíticos

PARÂMETRO	IDENTIDADE	IMPUREZAS		POTÊNCIA	COMPOSIÇÃO
		QUANTIDADE	LIMITES		
Exatidão		X		X	X
Precisão		X		X	X
Linearidade e extensão		X		X	X
Seletividade (especificidade)	X	X	X	X	X
Limite de Detecção	X		X		
Limite de Quantificação		X			
Robustez	X	X	X	X	X

FONTE: A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements - Part 2: Validation. WHO, 1997a.

Embora existam várias publicações que descrevem em termos gerais os critérios a serem medidos para cada tipo de teste (United States Pharmacopoeia, 1982; Council of Europe, 1996) cada projeto de validação deve ser delineado individualmente levando-se em consideração o tipo e o uso do ensaio a ser analisado. Para os métodos físico-químicos há limites bem definidos para os diversos parâmetros a serem analisados (ANVISA, 2003). Já para os bioensaios esses limites são muito variáveis. Segundo a WHO, (1997a) há 3 amplas categorias de bioensaios usadas para testes de produtos biológicos: ensaios de ligação, em células e com animais.

Os testes de ligação são aqueles que envolvem a ligação de duas ou mais moléculas, como por exemplo, os ensaios imunológicos. Os testes em células são aqueles em que o produto provoca uma reação mensurável em uma célula específica e são frequentemente utilizados para testes de potência. Já os ensaios com animais são utilizados para testes de pirogênio, segurança geral e potência. Ainda segundo a WHO (1997a), enquanto os ensaios de ligação apresentam variabilidade em uma faixa de 5 a 20%, os ensaios em células ou animais podem apresentar variabilidade acima de 50%.

O Instituto Butantan, tradicional produtor de soros e vacinas, também tem realizado avanços na produção e controle de imunobiológicos. Alguns testes têm sido desenvolvidos em células ou em ensaios de ligação, objetivando a substituição de animais. Assim foram estabelecidos os testes de titulação e de soroneutralização de vírus rábico em células BHK-21, para monitorar a produção de suspensões daquele vírus e para testar a potência de soros anti-rábicos, respectivamente.

1.2 Titulação de vírus rábico em células BHK-21 [CIT]

Durante a produção da vacina contra raiva é necessário monitorar a quantidade de vírus presente em suspensão em diversas fases do processo. A titulação dessas suspensões era feita em cérebros de camundongos suíços, sendo necessário, em média, 40 camundongos para realizar cada teste. Com a mudança da metodologia de produção de vacina tipo Fuenzalida & Palacios [em cérebros de camundongos] para vacina em células Vero, entre 1997 e 2007, também se fez a mudança da técnica de titulação viral, de camundongos para células BHK-21,

denominada CIT ["Cell Infection Titration"]. A titulação do vírus rábico é também realizada em todos os testes de soroneutralização, como um controle dessa metodologia.

1.3 Soroneutralização [SN] de vírus rábico em células BHK-21

Testes de soroneutralização viral são muito utilizados para a dosagem de anticorpos anti-rábicos. Esses testes consistem basicamente em incubar misturas de diluições de soro com uma quantidade fixa de vírus rábico por 60-90 minutos a 37 °C. A infectividade residual do vírus é então revelada por inoculação em camundongos (Webster e Dawson, 1935 apud Smith, Yager e Baer, 1996) ou em culturas de células, como o "Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test - RFFIT" (Smith, Yager e Baer, 1996) e o "Fluorescence Inhibition Microtest - FIMT", um método adaptado a microplacas de 96 orifícios (Zalan, Wilson e Pukitis, 1979).

Como a precisão dos testes em animais é limitada (Smith, 1991), as avaliações em linhagens celulares estáveis têm sido cada vez mais utilizados. Um estudo dirigido pelo "International Laboratory for Biological Standards, State Serum Institute, Copenhagen, Denmark" em oito laboratórios demonstrou que o teste de RFFIT é mais confiável do que o realizado em animais (Lyng, Bentzon e Fitzgerald, 1989), levando a WHO a recomendar essa técnica como a mais adequada para a avaliação da potência das imunoglobulinas anti-rábicas [RIG] (WHO, 1998). As farmacopéias dos Estados Unidos da América (2007) e Européia (Council of Europe, 2005) adotaram o RFFIT como teste oficial de controle de qualidade para as RIG por ser mais exato, reprodutível, rápido e mais barato do que o teste em camundongos.

No Instituto Butantan foi estabelecido, desde 1997, um método de dosagem de anticorpos anti-rábicos em células BHK-21 em microplacas de 96 orifícios, baseado nos métodos de RFFIT e FIMT; um estudo de validação desse método foi realizado em colaboração do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde [INCQS] (Moura et al., 2008), demonstrando que o mesmo é confiável e adequado para analisar a potência do soro anti-rábico.

Webster LT, Dawson JR. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. Proc Soc Exp Biol Med. 1935;32:570-3.

Esse teste é também utilizado para dosagem de soros humanos, para controle da imunidade de profissionais que trabalham expostos ao risco da raiva (WHO, 1992) ou de animais utilizados no estudo da imunogenicidade de vacinas contra raiva (Ashwathnarayana et al., 2009; Shantavasinkul et al., 2010)

1.4 Vacina contra raiva

A raiva é fatal em quase a totalidade dos indivíduos que desenvolvem os sintomas clínicos dessa doença. Entre os poucos sobreviventes, a maioria ficou com sequelas após a infecção pelo vírus (Winkler et al., 1973). Dois pacientes que receberam um novo tratamento denominado protocolo de Milwaukee, baseado na indução de coma medicamentoso e administração de antivirais, sobreviveram à doença (Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2009; Willowghby et al., 2005). Entretanto, a aplicação do mesmo tratamento falhou em outros casos (Jackson, 2009).

O agente causador dessa doença é um vírus RNA de fita simples e polaridade negativa pertencente à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*. Esse gênero é formado por uma coleção de vírus geneticamente relacionados e adaptados à replicação no sistema nervoso central de mamíferos (Rupprecht, Hanlon e Hemachudha, 2002).

Os lyssavírus apresentam a forma de um projétil de aproximadamente 75 x 200nm, sendo compostos por um nucleocapsídeo helicoidal, envolvido por um envelope lipo-protéico, recoberto por projeções em forma de espículas de 10nm de comprimento. No nucleocapsídeo encontram-se o RNA, cujos genes codificam as cinco proteínas que compõem o vírion, uma polimerase para a síntese de RNA (L), uma nucleoproteína que encapsula o RNA viral (N) e uma fosfoproteína, importante na transcrição, replicação e na interação com componentes protéicos das células durante o transporte através dos axônios (P). No envelope encontram-se a proteína de matriz (M) e uma glicoproteína (G) trans-membranária que medeia a recepção e a fusão à superfície das células, servindo como alvo para indução de anticorpos vírus-neutralizantes (Wunner et al., 1988; Gaudin et al., 1999; Poisson et al., 2001).

São conhecidas onze espécies, divididas em dois filogrupos, com base em características genéticas, sorológicas e na patogenicidade em camundongos:

Quadro 2 - Filogrupos e espécies do vírus rábico

FILOGRUPOS	ESPÉCIES
1	Vírus rábico clássico (RABV) Vírus Duvenhage (DUVV) European bat lyssavirus (EBLV-1) European bat lyssavirus (EBLV-2) Australian bat lyssavirus (ABLV) Vírus Aravan (ARAV) Vírus Khujand (KHUV) Vírus Irkut (IRKV)
2	Vírus Lagos bat (LBV) Vírus Mokola (MOKV)
--	West Caucasian bat virus (WCBV)

O vírus rábico clássico é encontrado em todo o mundo em vários mamíferos, principalmente carnívoros e morcegos nas Américas. A essa espécie pertencem também as cepas de vírus fixos utilizadas para produção de vacinas. Os vírus DUV, LBV e MOKV são encontrados em países africanos, principalmente em morcegos e em pequenos mamíferos. Os vírus EBLV-1 e EBLV-2 estão distribuídos entre morcegos na Eurásia e o ABLV em morcegos na Austrália (Badrane et al., 2001). Os vírus ARAV, KHUV, IRKV e WCBV foram isolados em morcegos na Ásia Central [ARAV e KHUV], na Sibéria [IRKV], no sudeste da Europa e no Quênia [WCBV] (Kuzmin et al., 2010).

A patogenia básica, os sinais clínicos, as técnicas de diagnóstico e as estratégias de prevenção e controle são os mesmos para todos os Lyssavirus e, para propósitos práticos, devem ser tratados como equivalentes (Charlton, 1994).

Geralmente a raiva é transmitida aos seres humanos através da mordida de um animal infectado com o vírus ou pelo contato de uma mucosa com fluídos contaminados com o vírus. Uma vez depositado na ferida, o vírus penetra nas células através de vários receptores (Lafon, 2005). Há então um longo período de incubação que em humanos dura, em média, de 20 a 60 dias, durante o qual ocorre a reação do sistema imune do hospedeiro. Nessa fase é possível intervir no processo infeccioso através do tratamento pós-exposição que combina a limpeza criteriosa da lesão com a administração de vacina isoladamente ou em associação com soro equino anti-rábico ou imunoglobulina humana específica. Se não houver a

eliminação total pelos mecanismos de defesa naturais ou induzidos, o vírus replica-se no interior das células musculares ou epiteliais e, ao ser liberado pela membrana plasmática, penetra nas terminações nervosas sendo transportado aos gânglios basais e células da medula espinhal. Nesses locais o vírus prolifera novamente, iniciando-se os sintomas prodrômicos ou preliminares, que são vagos, variados e inespecíficos. Aproximadamente um terço dos pacientes agredidos por cães e três quartos dos agredidos por morcegos apresentam sintomas no local da mordida, como dor, queimação, dormência, formigamento ou coceira. Nessa fase o tratamento com vacina e soro anti-rábicos já não é capaz de evitar a morte do paciente. Uma vez nas células nervosas ocorre uma rápida amplificação e disseminação viral através do brotamento pela membrana plasmática e transmissão célula a célula ou por propagação trans-sináptica. O vírus é transportado ao cérebro onde infecta neurônios de quase todas as regiões, período em que surgem os sintomas neurológicos agudos, segundo os quais a raiva pode ser classificada como clássica - formas encefalítica ou furiosa e parálitica ou muda - e não clássica. Em todos os casos a encefalite produz uma excitação do sistema nervoso central, preservando a consciência, alternando-a com períodos de inconsciência, ocorrendo uma paralisia progressiva até a instalação do coma, sucedido pela morte do doente por parada cardíaca ou respiratória (Hemachudha, Laothamatas e Rupprecht, 2002). Para completar o ciclo infeccioso, o vírus é disseminado por um processo centrífugo a partir do cérebro, através das vias neurais, atingindo o miocárdio, a pele e outros órgãos, especialmente as glândulas salivares (Li, Feng e Ye, 1995).

A maioria dos casos de raiva humana ocorre nos países menos desenvolvidos, em geral transmitidos por cães. Somente na Índia ocorrem de 25.000 a 30.000 casos por ano (Sudarshan et al., 2007), enquanto na África central esse número é desconhecido por falta de notificação (Dodet et al., 2008). Em todo o mundo morrem mais de 55.000 pessoas por ano devido a essa zoonose (WHO, 2008)

A prevenção da raiva humana deve ser feita através da implementação constante de programas de educação, da aplicação de primeiros socorros e técnicas de diagnóstico adequados, do uso de imunobiológicos modernos (soro e vacina) e da eliminação da raiva em seus hospedeiros animais (WHO, 2008). Há muitos anos vacinas contra raiva altamente eficazes e seguras para uso humano estão

disponíveis comercialmente, mas, enquanto nos países desenvolvidos são utilizadas vacinas purificadas, em culturas de células, em alguns países menos desenvolvidos ainda são usadas vacinas de tecido nervoso animal (WHO, 2007).

A concepção de prevenção da raiva humana com a utilização de vacinas e soros específicos, mesmo após a exposição ao vírus, teve início no final do século XIX com o desenvolvimento da primeira vacina de Pasteur. Essa vacina consistia de uma suspensão de vírus fixo cultivada em medulas de coelhos dessecadas a 22 °C durante um tempo variável. (Raw e Sant'anna, 2001). Desde então novas metodologias têm sido desenvolvidas para produzir vacinas mais eficazes e seguras. Inicialmente foram desenvolvidas vacinas utilizando tecido nervoso de animais adultos, parcial ou totalmente inativados (Fermi, 1908; Semple, 1911), de animais recém-nascidos, como camundongos (Fuenzalida e Palacios, 1955) e coelhos (Gispén et al., 1965) ou tecido não nervoso, como embriões de pato (Peck, Powell e Culberston, 1955).

A primeira vacina comercial em cultura de células para uso humano foi preparada em por Wiktor et al (1964) em células diplóides humanas WI-38 [HDCV- Human Diploid Cell Vaccine], que induzia à produção de anticorpos neutralizantes em níveis elevados com menor número de doses (Wiktor et al., 1969) e apresentava um índice de reações neurológicas muito baixo (Fishbein et al., 1993). A partir daí foram desenvolvidas diversas vacinas em culturas de células primárias, como as de rim de hamster [PHKC - primary hamster kidney cell vaccine] (Fangtao et al., 1983; Selimov e Aksenova, 1966) e embrião de galinha [PCEC - purified chick-embryo cell vaccine] (Kondo, Takashima e Suzuki, 1974); em outras células diplóides, como de pulmão de feto de macaco Rhesus [RVA - Rhesus vaccine adsorbed] (Berlin et al., 1982; Burgoyne et al., 1985) e em células heteroplóides Vero, (PVRV - purified Vero cell rabies vaccine) (Montagnon, Fournier e Vincent-Falquet, 1985; Roumiantzeff, Ajjan e Vincent-Falquet, 1985).

Visando o controle da raiva em algumas espécies silvestres, nos anos 70 e 80 foram desenvolvidas as primeiras vacinas orais e sistemas de iscas, primeiro com vírus rábicos atenuados, como a cepa ERA ou com vírus inativados (Baer, 1976; Black e Lawson, 1980) e após com vacinas recombinantes, como a V-RG, "Vaccinia Rabies Glycoprotein". Essas vacinas levaram ao controle da raiva em algumas espécies terrestres silvestres, como raposas, coiotes e racoos (Cross, Buddle e

Aldwell, 2007). Avanços na vacinação da vida silvestre foram estendidos aos cães em países menos desenvolvidos (Estrada et al., 2001; Hammami et al., 1999). Entretanto essas vacinas orais são vivas e não são inteiramente livres de risco (Rupprecht, Hanlon e Hemachudha, 2002).

Com os avanços na virologia molecular, tem sido possível criar vacinas de vírus atenuado através de engenharia genética, purificar antígenos virais produzidos em sistemas de expressão de proteínas altamente eficiente ou expressar antígenos virais através da inserção de seus genes em diferentes sistemas. Com essas tecnologias, novas vacinas contra raiva têm sido desenvolvidas e testadas recentemente (Cenna et al., 2008; Faber et al., 2009; Gupta et al., 2005; Loza-Rubio et al., 2008; Lyons et al., 2008).

Na última década houve um grande aumento da compreensão das vias imunológicas básicas, que promovem a resposta imune. A ativação da resposta imune inata mostrou-se crucial para a indução da resposta imune adaptativa e sinais envolvidos na ativação das células imunes inatas têm sido identificados, como os receptores de membrana “Toll-like” [TLRs] e os receptores de citoplasma “NOD-like” (Benko et al., 2008). Esses conhecimentos têm levado ao desenvolvimento de novos tipos de adjuvantes, como as CPG oligodeoxinucleotídeos [ODNs], que ativam o sistema imune inato através da ligação ao TLR-9. O uso desse tipo de adjuvante tem se mostrado altamente vantajoso em relação ao alumen em testes em camundongos (Wang, 2008).

É importante salientar, no entanto, que essas novas vacinas e adjuvantes ainda necessitam de extensos testes pré-clínicos e clínicos, comparando-as às vacinas comerciais utilizadas atualmente.

O Instituto Butantan forneceu a vacina tipo Semple produzida em cérebros de carneiros adultos no período de 1957 a 1963, e tipo Fuenzalida e Palacios preparada em cérebros de camundongos recém-nascidos no período de 1964 a 2000; e desde 1958, o soro anti-rábico heterólogo produzido em cavalos. Em 2008 iniciou-se a produção da vacina Vero-IB (Frazatti-Gallina et al., 2004), desenvolvida em células Vero, onde o vírus rábico fixo da cepa PV proveniente do Instituto Pasteur de Paris é replicado em células aderidas a microcarregadores, utilizando meio de cultura sem proteínas de origem animal. As suspensões de vírus obtidas são concentradas e purificadas por ultra-filtração tangencial e cromatografia de troca

iônica e inativadas com β -propiolactona. Testes de controle de qualidade realizados em todas as fases de produção demonstraram a segurança e a potência dessa vacina.

1.5 Avaliação de imunogenicidade de vacinas

O desenvolvimento e aprovação de uma vacina dependem da demonstração de sua eficácia, que pode ser relacionada com algumas medidas da resposta imune.

A resposta humoral depende da forma de apresentação do antígeno, da cooperação entre classes de linfócitos, da estimulação de citocinas e do repertório de células B disponíveis no momento dessa estimulação. Após o processamento do antígeno por células apresentadoras que incluem uma variedade de linfócitos B com um largo espectro de afinidades para o mesmo, há intensa divisão celular. No início da resposta, um número variável de clones de baixa afinidade pode ser detectado. A estimulação antigênica das células B conduz a processos posteriores de hipermutação e seleção, ocorrendo um processo altamente organizado e de propósito definido, provavelmente operado nos centros germinativos, formando plasmócitos e células de memória. Após cada dose de reforço, o repertório de células de memória entra novamente no ciclo de hipermutação e seleção, gerando um aumento dos plasmócitos, cujo pico [de até 100 vezes o nível basal] é atingido no sétimo dia no sangue periférico. O aumento dos plasmócitos coincide com um aumento violento nos anticorpos séricos, que atingem um platô no 10º dia (Lanzavecchia e Sallusto, 2009). Há, ainda, um aumento quantitativo no número de mutações somáticas observadas entre as respostas primária, secundária e terciária (Berek e Milsten, 1988).

Embora a resposta mediada por células seja reconhecidamente importante para a proteção, esta atua em conjunto com a resposta humoral; e a maioria das vacinas licenciadas, se baseia na indução da produção de anticorpos séricos para comprovar sua eficácia (Plotkin, 2001). Essa característica depende da funcionalidade dos anticorpos, como a habilidade de neutralizar patógenos. No caso das vacinas contra a raiva, a WHO recomenda que seja feito um estudo da indução de anticorpos neutralizantes, inicialmente em animais e posteriormente em seres humanos, seguindo um esquema de imunização reconhecido. O nível de indução e

persistência de anticorpos não deve ser menor que o observado após a imunização com uma vacina de eficácia comprovada; os títulos de anticorpos neutralizantes devem ser determinados por soroneutralização em camundongos ou em células. Considera-se protetor, nível de anticorpos neutralizantes maiores ou igual a 0,5 UI/ml (WHO, 1992).

Resumindo, pode-se considerar que uma resposta imune eficiente seja o resultado da interação entre o antígeno e uma rede de células imunologicamente competentes. Além dos aspectos constitutivos genéticos da população imunizada, a natureza qualitativa e quantitativa da resposta imune é determinada por vários fatores ambientais como a natureza do antígeno e sua concentração, a via de administração e o esquema utilizado: características que influenciam profundamente o resultado da resposta imune.

1.6 Esquemas de imunização anti-rábica

Os primeiros esquemas de imunização anti-rábica, utilizados com vacinas do tipo Pasteur, Semple ou Fuenzalida & Palacios, constavam de doses diárias, que podiam variar em número de 14 a 28, dependendo do tipo de vacina e da gravidade da exposição. Com o desenvolvimento de vacinas mais potentes, vários esquemas de vacinação foram sendo estudados, variando-se a via de administração (intramuscular, subcutânea ou intradérmica), o número de doses e os intervalos entre as mesmas (Favoretto et al., 1993; Nicholson, Turner e Aoki, 1978; Roumiantzeff et al., 1988; Strady et al., 2001; Zanetti et al., 1989).

Os esquemas que utilizam a administração de pequenas doses de vacina em vários pontos por via ID foram desenvolvidos como uma alternativa econômica para as vacinas de tecido nervoso. Esses esquemas têm-se mostrado eficientes para proteção de indivíduos agredidos por animais raivosos, entretanto, sua aplicação traz algumas desvantagens. Os títulos de anticorpos formados são mais baixos e menos duradouros do que os obtidos com as aplicações por via intramuscular (Briggs e Schwenke, 1992; Sabchareon et al., 1995) e sua administração é restrita aos grandes centros de atendimento, pois a vacina reconstituída deve ser usada num período de até 8 horas e conservada entre 4 e 8 °C. Nas exposições consideradas graves, junto com a primeira dose de vacina, devem ser administrados

40 UI/Kg de peso do paciente de soro heterólogo ou 20 UI/Kg de peso do paciente de imunoglobulina humana anti-rábica.

Atualmente, para vacinas obtidas em culturas de células ou em embriões de pato, com pelo menos 2,5 UI/mL, a WHO recomenda a utilização de um dos seguintes esquemas para pós-exposição:

Quadro 3 - Esquemas de imunização anti-rábica humana para pós-exposição

ESQUEMAS	VIA	DIAS						
		0	3	7	14	21	28	90
BÁSICO	IM	1d*	1d	1d	1d	--	1d	--
ALTERNATIVO	IM	2d*	--	1d	--	1d	--	--
2 PONTOS	ID	2d**	2d	2d	--	--	1d	1d
8 PONTOS	ID	8d**	--	4d	--	--	1d	1d

im: via intramuscular

id: via intradérmica

d: dose

*Nos esquemas que empregam a via intramuscular o volume de vacina administrado é de 0,5 ou 1,0 mL dependendo do fabricante.

**Nos esquemas que empregam a via intradérmica utiliza-se um quinto dessa dose (0,1 ou 0,2 mL).

Em ambos o volume independe da idade ou do peso do paciente.

FONTE: *WHO recommendations on rabies post-exposure treatment and the correct technique of intradermal immunization against rabies. WHO, 1997b.*

O esquema intradérmico de 2 pontos (“2-2-2-0-1-1”) pode ser usado com as vacinas PVRV, PCEC e PDEV e o de 8 pontos (“8-0-4-0-1-1”) com vacinas HDCV e PCEC (WHO, 1997b).

Para pré-exposição, a WHO recomenda a administração de três doses por via intramuscular ou intradérmica nos dias 0, 7 e 28; no entanto, alguns países utilizam outros esquemas de imunização. Na França e no Reino Unido, por exemplo, são utilizadas duas doses nos dias 0 e 28 (Strady et al., 1998). Atualmente tem-se recomendado também uma dose de reforço um ano após a base (Strady et al., 2001). No Japão, o esquema de vacinação empregado para pré-exposição inclui três doses por via subcutânea nos dias 0, 28 e 180 (Arai et al., 2002).

Há também uma preocupação em reduzir o número de doses de vacina e, conseqüentemente de idas ao posto de vacina para reduzir não apenas os custos, mas também o número de tratamentos incompletos por abandono. Alguns estudos têm sido realizados nesse sentido (Shantavasinkul et al., 2010)

A WHO (2008) recomenda a imunização pré-exposição para todos os indivíduos que vivem ou viajam para áreas altamente endêmicas e ainda para profissionais que podem se expor à contaminação pela natureza do seu trabalho e encoraja novos estudos sobre a viabilidade, relação custo-benefício e impacto a longo prazo sobre a incorporação de vacina contra raiva nos programas de imunização de crianças em comunidades onde a raiva é prevalente.

Estudos de imunogenicidade da vacina Vero-IB foram realizados no Instituto Butantan com duas ou três doses de vacina em camundongos das linhagens N:NIH e geneticamente selecionados para alta [H_{III}] e baixa [L_{III}] produção de anticorpos (Biozzi et al., 1979) e em macacos Rhesus (Espíndola, 2005; Frazatti-Gallina, 2005; Mourão-Fuches, 2003). Além do alto grau de imunogenicidade da vacina esses estudos demonstraram que o maior intervalo entre as doses de vacina leva a uma melhor duração da resposta imunológica, provavelmente devido à indução de memória imunológica mais efetiva.

1.7 Sílicas mesoporosas altamente ordenadas

As sílicas mesoporosas são partículas de óxido de silício [SiO₂] com estrutura altamente organizada, capazes de interagir com átomos, íons e moléculas em sua superfície ou em seu interior (Kresge et al., 1992; Yang, Coombs e Ozin, 1997).

A sílica nanoestruturada mesoporosa SBA-15 apresenta estrutura hexagonal com poros de 3,1 a 6,4nm, altamente ordenados e interligados, e notável estabilidade térmica, hidrotérmica e mecânica (Matos et al., 2007; Zhao et al., 1998). A SBA-15 é sintetizada em meio ácido, utilizando como agente direcionador de estrutura um copolímero tribloco, o poli[óxido de etileno-poli[óxido de propileno]-poli[óxido de etileno] [EO₂₀PO₇₀EO₂₀], que pode agregar-se com espécies de silicatos formando a sílica mesoporosa (Zhao et al., 1998).

O primeiro estudo de viabilidade de emprego da sílica mesoporosa SBA-15 como adjuvante da imunidade realizou-se no laboratório de Imunoquímica do

Instituto Butantan. Nesse estudo, camundongos isogênicos BALB/c e geneticamente selecionados para baixa produção de anticorpos [L_{III}] imunizados com Intimina 1β [proteína de *E. coli*] ou veneno total de *Micrurus ibiboboca* encapsulado/adsorvido à SBA-15 apresentaram aumento significativo dos títulos de anticorpos específicos para a proteína e para o veneno, sendo a resposta secundária semelhante ou mais elevada do que a dos animais imunizados com esses antígenos em adjuvante de Freund incompleto ou hidróxido de alumínio [Al(OH)₃] (Mercuri et al., 2006). Ainda verificou-se que a sílica SBA-15 foi capaz de modular positivamente a resposta imune humoral de camundongos maus respondedores [L_{III}; L_{IV}], os quais após imunizações com soroalbumina bovina [SBV] pelas vias oral e intramuscular passaram a produzir títulos de IgG semelhantes aos bons respondedores [H_{III}; H_{IV}] (Carvalho, 2007). Esses dados em conjunto indicam a participação da SBA-15 na ativação do sistema imunológico e na indução de memória, mecanismo essencial para a proteção induzida por processo de vacinação.

Os estudos que vem sendo coordenados pelos Profs. Osvaldo Augusto Sant'Anna [Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan] e Márcia Fantini [Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física da Universidade de São Paulo] poderão contribuir para o desenvolvimento das primeiras Nanovacinas. Em 12 de setembro de 2005, foi depositada a Patente *COMPLEXO IMUNOGÊNICO FORMADO POR ANTÍGENOS VACINAIS ENCAPSULADOS POR SÍLICA MESOPOROSA NANOESTRUTURADA*, em parceria com o Laboratório Cristália, que recebeu o número PI 0503817-0 e, em setembro de 2007, foi feito o depósito internacional PCT: **WO 07030901**.

2 OBJETIVOS

O presente estudo visou validar os testes *ex-vivo* utilizados em estudos de imunogenicidade da vacina contra raiva e controle de potência de soro anti-rábico. Ainda, estabelecer um protocolo de testes pré-clínicos em animais para avaliação de imunogenicidade, eficácia e inocuidade, podendo ser aplicado em testes com novas vacinas desenvolvidas no Instituto Butantan.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Validação do teste de Titulação de vírus rábico em células BHK-21 [CIT]

3.1.1 Suspensão de vírus

Todos os testes foram realizados com o lote de vírus rábico controle produzido pela Seção de Raiva do Instituto Butantan [VRC/ CVS/BHK21-01/08]. Este banco foi preparado a partir de suspensões de vírus rábico obtidas de células BHK-21 infectadas com o vírus CVS11 [cepa origem: ATCC - VR959]. O banco de vírus rábico foi liberado para uso após ser submetido a testes de Controle de Qualidade [Pesquisa de Agentes Adventícios, Identidade Viral, Pesquisa de Micoplasma e Esterilidade Fúngica e Bacteriana] e apresentado resultados satisfatórios em todos eles.

A suspensão viral foi aliqüotada em tubos tipo eppendorff contendo 200 µL e armazenada em freezer a -70 °C. O conteúdo de cada eppendorf foi descongelado em água corrente no momento do uso.

3.1.2 Células BHK-21

As células utilizadas no teste de CIT foram provenientes do Banco de Células BHK-21 da Seção de Raiva do Instituto Butantan, originário da linhagem celular BHK-21, clone 13 [ATCC- CCL-10]. Esse banco foi submetido a testes de controle de qualidade [Agentes Adventícios, Esterilidade Fúngica e Bacteriana e Pesquisa de Micoplasma] e apresentou resultados satisfatórios em todos eles.

3.1.3 Realização do teste

Amostras de 50 µL de vírus rábico diluídas em série na base 10, em meio Eagle-MEM com 2,5% de soro fetal bovino [SFB] foram adicionadas a 100 µL de meio contendo $3,7 \times 10^4$ células BHK-21 em microplacas de poliestireno com 96 orifícios. Controles de células foram feitos em dois orifícios em todas as placas. Após incubação a 37 °C em estufa com 5% de CO₂ por 22 horas, o meio foi descartado,

as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfatos [PBS] e fixadas por 10 minutos com solução de acetona a 80% em água purificada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após secagem das microplacas por 10 minutos à temperatura ambiente, as células foram marcadas com imunoglobulina antinucleocapsídeo rábico conjugada com fluoresceína [Bio-Rad, Marnes La Coquette, France-cat. 72114] por uma hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e lavadas três vezes com PBS. Após adição de $70\text{ }\mu\text{L}$ de glicerina tamponada pH 8,5 a cada orifício, as placas foram observadas em microscópio de fluorescência [10 campos em cada orifício da microplaca], com aumento de 100 vezes. Foram considerados positivos os campos que continham um ou mais focos fluorescentes e anotados os números de campos positivos por número de campos observados para cada diluição da amostra. Os títulos virais foram calculados como o inverso da diluição capaz de produzir focos fluorescentes em metade dos campos observados.

Um esquema do procedimento descrito acima está apresentado na figura 1.

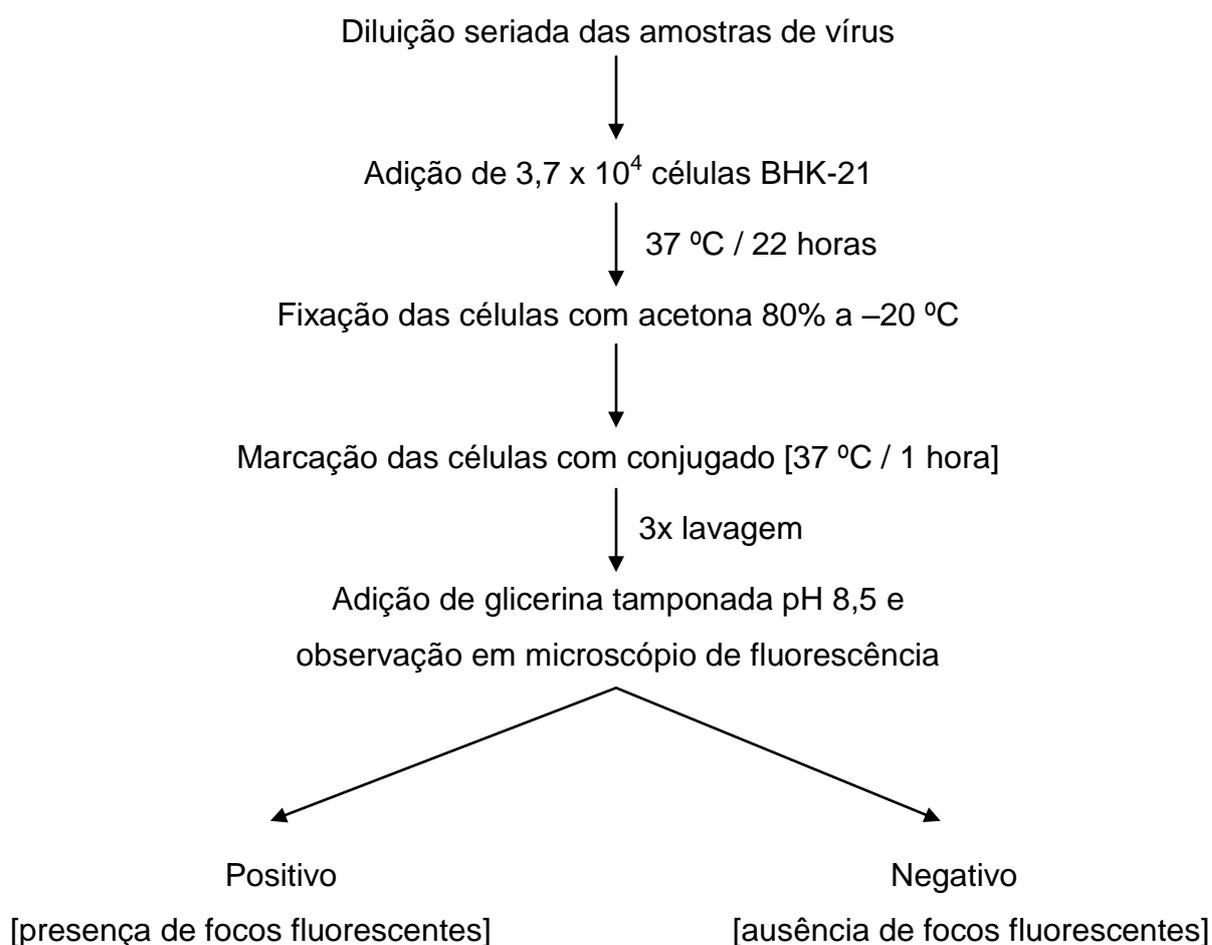


Figura 1 - Esquema do teste de CIT para titulação do vírus rábico

3.1.4 Parâmetros de validação de cada teste realizado

Somente foram considerados válidos os testes que:

- apresentaram título viral entre a menor e a maior diluições utilizadas no teste;
- apresentaram curva dose-resposta com regressão significativa;
- não apresentaram desvios de linearidade ou paralelismo.

3.1.5 Parâmetros analisados para validação do método

Foram analisados linearidade, exatidão, precisão [intra e inter-ensaios] e robustez [influência do tempo entre a descongelamento da amostra e a diluição da mesma no teste e estabilidade ao congelar e descongelar amostras].

3.1.5.1 Linearidade e Exatidão

Para análise da linearidade e da exatidão foram preparadas 7 diluições da amostra, conforme o quadro a seguir:

Quadro 4 - Diluições de suspensão de vírus rábico utilizadas para análise de linearidade e exatidão em testes de CIT

DILUIÇÃO DA AMOSTRA	TÍTULO VIRAL ESPERADO*
1/1 (Não diluída)	$10^{4,50}$
1:3,2	$10^{4,00}$
1:10	$10^{3,50}$
1:32	$10^{3,00}$
1:100	$10^{2,50}$
1:320	$10^{2,00}$
1:1000	$10^{1,50}$

*Título viral em logaritmo na base 10

Foram testadas três replicatas de cada diluição em três dias diferentes, fazendo um total de nove replicatas para cada diluição; foram calculadas médias [X],

desvios-padrão [DP], porcentagens de recuperação, coeficientes de variação [CV] expressos em % e coeficientes de correlação das curvas dose-resposta [r].

A linearidade foi analisada em cada grupo de diluições e pela média de todos os resultados. Foram estabelecidos como critérios de aceitação $r \geq 0,98$, conforme recomendação da ANVISA (2003) para métodos bioanalíticos e $CV \leq 20\%$.

A exatidão foi analisada pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. Como critério de aceitação, o desvio não deve exceder 15%, conforme recomendação da ANVISA (2003).

3.1.5.2 Precisão

Para análise da precisão foram preparadas 3 diluições da amostra, conforme o quadro a seguir:

Quadro 5 - Diluições de suspensão de vírus rábico utilizadas para análise de precisão em testes de CIT

DILUIÇÃO DA AMOSTRA	TÍTULO VIRAL ESPERADO*
1/1 (Não diluída)	$10^{4,50}$
1:32	$10^{3,00}$
1:1000	$10^{1,50}$

*Título viral em logaritmo na base 10

Para a precisão intra-ensaio foram testadas 10 replicatas de cada diluição em um único dia.

Para a precisão inter-ensaios foram testadas:

- 3 replicatas de cada diluição no mesmo dia, pelo mesmo operador, mas usando outros lotes de material;
- 3 replicatas de cada diluição no mesmo dia, com o mesmo lote de material, mas por outro operador;
- 3 replicatas de cada diluição com o mesmo lote de material e o mesmo operador, mas em outro dia.

A partir dos resultados brutos obtidos foram calculados a X, o DP e o CV para cada diluição estudada.

Os resultados das amostras diluídas à 1:32 e 1:1.000 foram normalizados através do cálculo do título correspondente à amostra não diluída. Esses resultados foram utilizados para cálculos de X, DP e CV geral de todos os resultados. Os CV para cada conjunto e para o total dos dados devem ser $\leq 20\%$.

3.1.5.3 Robustez

Eppendorfs contendo 200 μL da suspensão viral não diluída, diluída a 1/32 e 1/1.000 foram congelados diretamente em freezer a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ e mantidos a essa temperatura até o momento do uso.

3.1.5.3.1 Influência do tempo entre a descongelação da amostra e a execução do teste

Oito eppendorfs de cada diluição analisada foram descongelados em água corrente e mantidos à temperatura ambiente [$18\text{-}22\text{ }^\circ\text{C}$] por um período que variou de 0 a 90 minutos, sendo que dois eppendorfs de cada diluição foram utilizados para fazer titulações a intervalos de 30 minutos [0, 30, 60 e 90 minutos após a descongelação]. A partir dos resultados obtidos foram calculados a X, o DP e o CV para cada diluição estudada. O CV deve ser $\leq 20\%$.

3.1.5.3.2 Estabilidade ao congelar e descongelar amostras

As amostras não diluídas, diluídas a 1/32 e 1/1.000, armazenadas a $-70\text{ }^\circ\text{C}$, foram testadas em duplicata após múltiplos [1 a 6] processos de descongelação e recongelação. A cada processo as amostras permaneceram descongeladas por 30 minutos e, ao serem recongeladas, permaneceram a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ por no mínimo 3 horas. A partir dos resultados obtidos foram calculados a X, o DP e o CV para cada diluição estudada. O CV para cada conjunto de dados deve ser $\leq 20\%$.

3.2 Validação do teste de Soroneutralização [SN] de vírus rábico em células BHK-21

3.2.1 Reagentes utilizados

Para validação do teste de soroneutralização de vírus rábico em células BHK-21 em microplacas foram utilizados dois lotes de soro eqüino anti-rábico hiperimune, produto fracionado, concentrado e digerido com pepsina [F(ab')₂] [lotes IB-R 01-09-14, com 4.000 UI/mL e IB-R 02-09-15, com 3.300 UI/mL], produzido no Instituto Butantan. O soro anti-rábico de referência utilizado foi o “2nd International Standard for Rabies Immunoglobulin”, com 30 UI/frasco, obtida de “National Institute of Biological Standardization and Control” [NIBSC, UK] e para infecção das células foi utilizado o vírus rábico controle produzido pela Seção de Raiva do Instituto Butantan [VRC/CVS/BHK21-01/08].

3.2.2 Realização do teste

Esse teste, baseado no Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test - RFFIT e no Fluorescence Inhibition Microtest - FIMT foi realizado em microplacas de 96 orifícios. Os soros inativados a 56 °C por 30 minutos foram diluídos em série na base 2, em meio Eagle-MEM com 2,5% de SFB. A cada uma dessas diluições foi adicionada uma quantidade fixa de vírus rábico CVS em células BHK-21. Paralelamente às amostras testadas, em cada microplaca foi utilizado um soro de referência internacional, fornecido pela WHO, e feita uma titulação do vírus CVS. A microplaca com as misturas de soro e vírus foi incubada a 37 °C por 90 minutos. Em seguida a cada orifício foram acrescentados $3,7 \times 10^4$ células BHK-21 e a microplaca foi novamente incubada a 37 °C em estufa com 5% de CO₂ por 22 horas, após o que as células foram lavadas com PBS pH 7,0, fixadas com acetona a 80% a -20°C por 10 minutos e marcadas com imunoglobulina antinucleocapsídeo rábico conjugada com isotiocianato de fluoresceína [Bio-Rad – cat. 72114] durante uma hora a 37 °C. Após lavagem em PBS foi adicionada a cada orifício glicerina tamponada pH 8,5. Foram observados 10 campos em cada orifício da microplaca em microscópio de fluorescência, com aumento de 100 vezes, sendo considerado positivo o campo que

continha um ou mais focos fluorescentes. A dose eficaz 50% [DE₅₀] de cada soro foi determinada pelo método de Probitos e os títulos de anticorpos neutralizantes, expressos em unidades internacionais [UI] por ml, segundo a fórmula:

$$\text{Título de ACN} = \frac{\text{inverso da DE}_{50} \text{ do soro teste} \times \text{título de ACN [UI/mL] da referência}}{\text{inverso da DE}_{50} \text{ da referência}}$$

Um esquema do procedimento descrito acima está apresentado na figura 2.

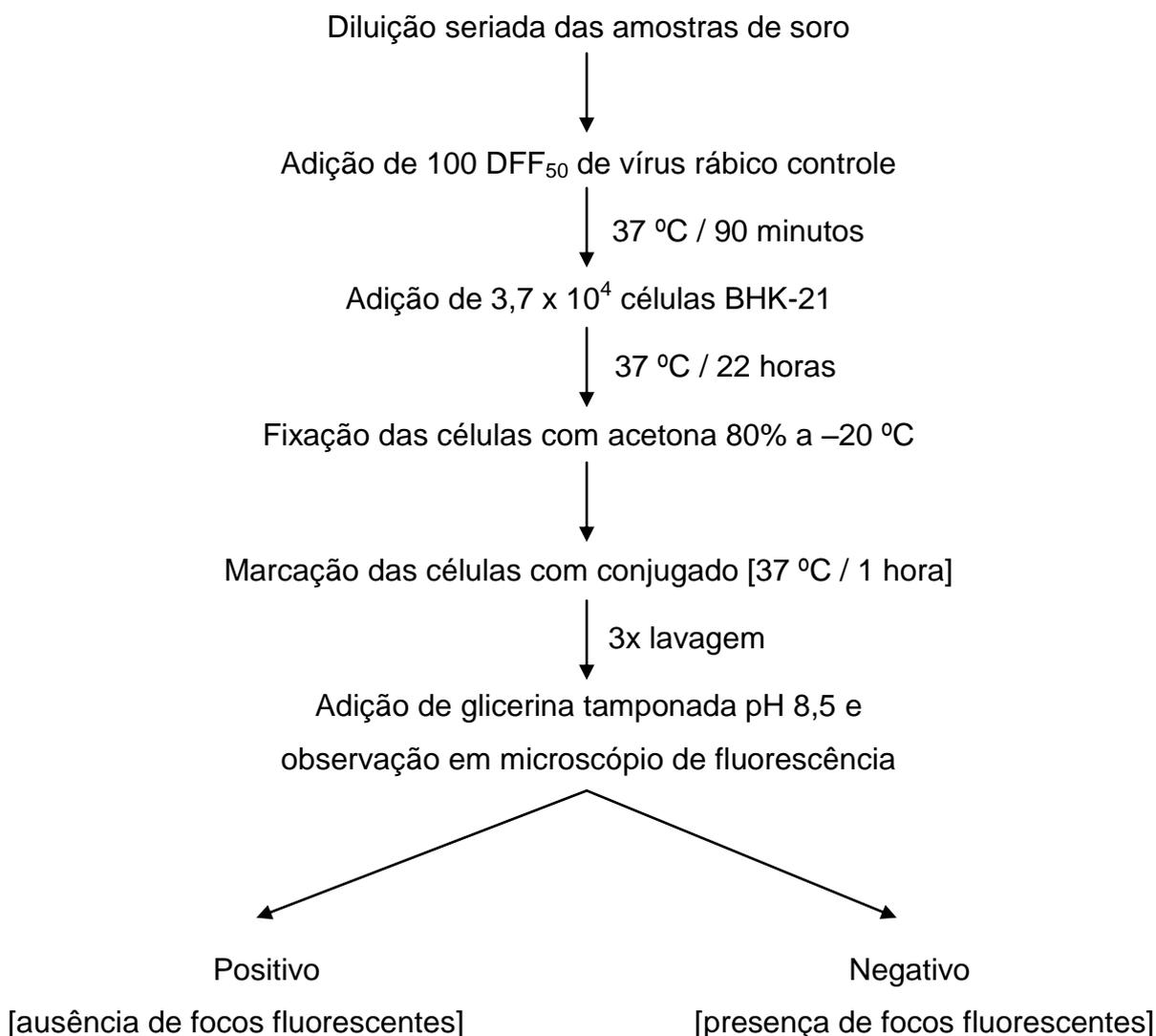


Figura 2 - Esquema do teste de SN em células BHK21 para dosagem de ACN

3.2.3 Parâmetros de validação de cada teste realizado

Somente foram considerados válidos os testes que:

- apresentaram de 30 a 300 doses formadoras de focos fluorescentes 50% [DFF₅₀/50µL] de suspensão viral, conferidas pela titulação do vírus rábico controle;
- apresentaram curva dose-resposta com regressão significativa e sem desvios de linearidade ou paralelismo;
- apresentaram DE₅₀ do soro referência dentro da faixa limite estabelecida pela análise de vários resultados desse soro pelo programa estatístico SPC-PC IV, da Quality America Inc.

3.2.4 Parâmetros analisados para validação do método

Foram analisados linearidade, exatidão, precisão intra e inter-ensaios e estabilidade ao congelar e descongelar amostras.

3.2.4.1 Linearidade e Exatidão

Para análise da linearidade foram preparadas 5 diluições da amostra, conforme o quadro a seguir:

Quadro 6 - Diluições de soro anti-rábico utilizadas para análise de linearidade e exatidão em testes de SN

DILUIÇÃO DA AMOSTRA	TÍTULO DE ACN ESPERADO [UI/mL]
1/1 (Não diluída)	3.300
1:10	330
1:100	33
1:1.000	3
1:10.000	0,3

ACN: Anticorpos anti-rábicos neutralizantes

Foram testadas 3 replicatas de cada diluição em três dias diferentes, fazendo um total de 9 replicatas para cada diluição. A linearidade foi analisada em cada grupo de diluições e pela média de todos os resultados. Foram estabelecidos como critérios de aceitação $r \geq 0,98$, conforme recomendação da ANVISA (2003) para métodos bioanalíticos e $CV \leq 20\%$.

A exatidão foi analisada pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. Como critério de aceitação, o desvio não deve exceder 15%, conforme recomendação da ANVISA (2003).

3.2.4.2 Precisão intra-ensaio

Para análise da precisão intra-ensaio [repetibilidade] foram preparadas 3 diluições da amostra, conforme o quadro a seguir:

Quadro 7 - Diluições de soro anti-rábico utilizadas para análise de repetibilidade em testes de SN

DILUIÇÃO DA AMOSTRA	TÍTULO DE ACN ESPERADO [UI/mL]
1/1 (Não diluída)	4.000
1:10	400
1:100	40

ACN: Anticorpos anti-rábicos neutralizantes

Foram testadas 5 replicatas de cada diluição em um único dia. A partir dos resultados brutos obtidos foram calculados a X, o DP e o CV para cada diluição estudada.

Os resultados das amostras diluídas à 1:10 e 1:100 foram normalizados através do cálculo do título correspondente à amostra não diluída. Esses resultados foram utilizados para cálculos de X, DP e CV geral de todos os resultados. Os CV para cada conjunto e para o total dos dados devem ser $\leq 20\%$.

3.2.4.3 Precisão inter-ensaios [intermediária]

Foram testadas replicatas do soro referência no mesmo dia, mas com operadores diferentes [3 testes] ou com o mesmo operador, mas em dias diferentes [10 testes]. A partir dos resultados obtidos calculou-se a X, o DP e o CV, sendo considerados o CV para cada conjunto de dados e para o total $\leq 20\%$.

3.2.4.4 Estabilidade ao congelar e descongelar amostras

O soro referência reconstituído foi distribuído em alíquotas de 100 μL em tubos tipo eppendorf e congelado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cada tubo foi descongelado 9 vezes, sendo retirados 10 μL a cada vez, para a realização dos testes de RFFIT.

A partir dos resultados obtidos foram calculados a X, o DP e o CV de todos os resultados. Também foi feita análise de variância (ANOVA). O CV para cada conjunto de dados deve ser $\leq 20\%$.

3.3 Estudo da imunogenicidade da vacina contra raiva com diferentes esquemas de imunização

3.3.1 Animais

Grupos de fêmeas de camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, entre 8 e 12 semanas de idade, criados e fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan, da cota de animais utilizados pela Seção de Controle Biológico para controle de soros e vacinas, foram imunizados com vacina contra raiva. Os animais foram mantidos no biotério de experimentação da Seção de Imunoquímica do Instituto Butantan durante os experimentos. Um grupo de animais não imunizados foi mantido como controle. Todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.3.2 Vacina contra raiva

Um lote de vacina contra raiva para uso humano, concentrado, purificado e inativado, produzido no Instituto Butantan, IB-VR/VERO/PC/P/I/M-01/09 foi utilizado no presente estudo. A vacina foi preparada a partir de suspensões de células Vero cultivadas em microcarregadores, em biorreator, infectadas com vírus rábico fixo Pasteur. Colheitas dos sobrenadantes foram concentradas e purificadas por ultrafiltração tangencial e cromatografia de troca iônica e inativadas com β -Propiolactona.

O lote passou por todos os testes de controle de qualidade exigidos habitualmente para as vacinas contra raiva de uso humano produzidas em células. A potência foi determinada pelo método dos “National Institutes of Health” [NIH] (Aubert, 1996), apresentando um resultado de 2,2 UI/mL.

3.3.3 Sílica mesoporosa nanoestruturada

A sílica mesoporosa SBA15 foi fornecida pelo Dr Jivaldo R. Matos do Instituto de Química da USP e pela Dra Márcia C. A. Fantini do Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física da USP. Para adsorção à sílica, a vacina foi misturada à SBA-15 na proporção 1:25 de antígeno:SBA-15 [v/v].

3.3.4 Esquemas de imunização

Cinco esquemas de imunização foram testados variando o número de doses aplicadas, o intervalo entre as mesmas, a via de inoculação e a concentração vacinal [Quadro 8]. A via oral [VO] foi administrada por gavagem com vacina contra raiva adsorvida ou não em SBA-15. Em todos os esquemas foi administrado um volume de 0,2 mL.

Quadro 8 - Esquemas de imunização anti-rábica em camundongos, com diferentes vias de inoculação, intervalos entre as doses e concentrações de antígeno

GRUPO	IMUNIZAÇÃO			
	Nº DE DOSES	VIA DE INOCULAÇÃO	DIAS	CONCENTRAÇÃO DO ANTÍGENO %
I	3	IP	0-7-28	100 [2,2 UI/mL]
II	2	IP	0-60	100 [2,2 UI/mL]
III	2	IP	0	10 [0,22 UI/mL]
			60	100 [2,2 UI/mL]
IV	2	VO	0	100 [2,2 UI/mL]
		IP	60	
V	2	VO + Sílica	0	100 [2,2 UI/mL]
		IP	60	

IP: Via intraperitoneal VO: Via oral

3.3.5 Obtenção dos soros imunes

Amostras de sangue foram colhidas do plexo venoso retro-orbital com pipetas Pasteur, sete dias após a primeira dose de vacina para os grupos IV e V e nos dias 50, 78 e 106 para todos os grupos. Os soros individuais foram congelados a -20 °C. Como controle negativo, utilizou-se soros de camundongos normais obtidos nas mesmas condições descritas acima.

3.3.6 Determinação dos títulos de anticorpos neutralizantes

Os títulos individuais de anticorpos neutralizantes foram determinados pela técnica de soroneutralização de vírus rábico em células BHK-21, conforme descrito no item 3.2.2. Foram considerados como protetores os soros que apresentaram título de anticorpos neutralizantes $\geq 0,5$ UI/mL, conforme recomendação da WHO (1992). Para análise dos dados foram calculadas as médias dos títulos de anticorpos e as taxas de soro-conversão [SC], pela porcentagem de animais com soro protetor em relação ao número de animais imunizados.

3.4 Análise Estatística

Os títulos virais, as DE_{50} dos soros teste e referência e a potência dos soros em UI/mL foram calculados pelo método de Probitos, através do programa “CombiStats v.4.0, EDQM – Council of Europe”.

Os cálculos das médias geométricas, desvios-padrão, coeficientes de correlação e ANOVA foram realizados utilizando o Microsoft Excel.

O coeficiente de variação (CV) foi calculado segundo a fórmula:

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada; aqui calculada pela média geométrica dos resultados obtidos.

A exatidão foi calculada pela fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

A comparação entre os resultados obtidos com os diferentes esquemas de imunização foi feita através do teste t de Student com intervalo de confiança de 95% e considerados significativos quando $P \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Validação do teste de Titulação de vírus rábico em células BHK-21[CIT]

4.1.1 Linearidade

Duas abordagens foram utilizadas para avaliar a linearidade do teste: a correlação entre os títulos virais esperados e obtidos e a avaliação do coeficiente de variação para cada diluição da amostra.

4.1.1.1 Coeficiente de correlação [r]

Foram traçadas curvas dose-resposta entre os títulos virais esperados e obtidos em três dias de testes e pela média de todos os resultados [Figura 3].

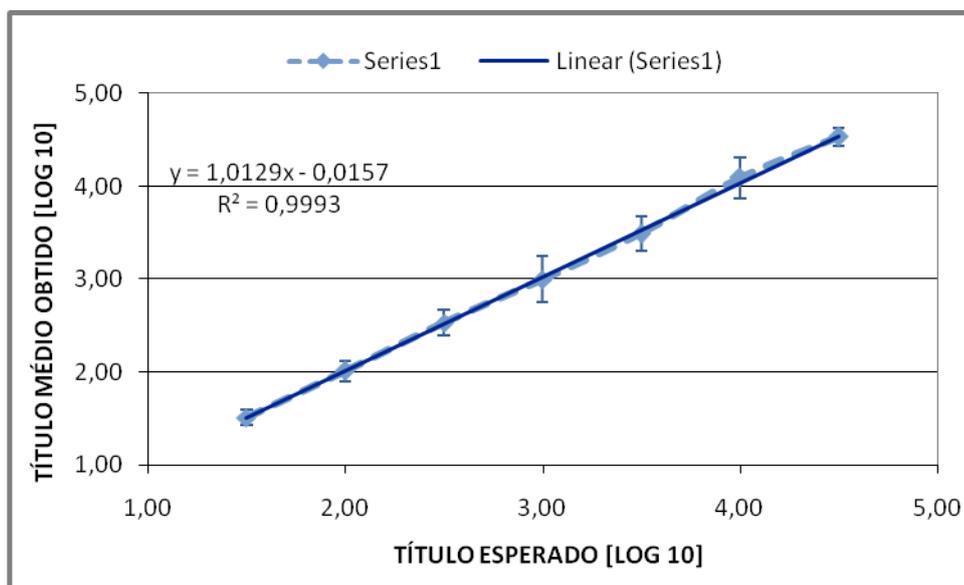


Figura 3 - Dispersão mostrando a correlação entre os títulos virais [log10 DFF₅₀/50 µL] esperados e médias obtidas em testes de CIT

Atendendo os critérios de aceitação, obteve-se $r > 0,98$ para todas as curvas, conforme tabela a seguir:

Tabela 1 - Coeficientes da regressão linear das curvas de calibração para o teste de Titulação de vírus rábico em células BHK-21 [CIT]

COEFICIENTES DA EQUAÇÃO LINEAR	TESTES			
	1º DIA	2º DIA	3º DIA	MÉDIA
a	0,9614	1,065	1,0143	1,0129
b	0,0343	0,0321	0,0486	0,0157
r	0,9945	0,9962	0,9993	0,9996

a = coeficiente angular; b = coeficiente linear; r = coeficiente de correlação

4.1.1.2 Coeficiente de variação [CV]

Os CV dos títulos virais obtidos para todas as diluições testadas ficaram dentro do limite de aceitação de até 20% [Tabela 2].

Tabela 2 - Títulos de vírus rábico [\log_{10} DFF₅₀/50 μ L] determinados pelo método de CIT e coeficientes de variação calculados para análise de linearidade do teste

DILUIÇÃO DA AMOSTRA	TÍTULO [\log_{10} DFF ₅₀ /50 μ L]			
	ESPERADO	OBTIDO		
		X	DP	CV %
1/1	4,50	4,53	0,10	2,2
1/3,2	4,00	4,09	0,22	5,4
1/10	3,50	3,49	0,18	5,1
1/32	3,00	3,00	0,25	8,2
1/100	2,50	2,53	0,14	5,6
1/320	2,00	2,01	0,11	5,6
1/1.000	1,50	1,51	0,08	5,4

X: Média Geométrica

DP: Desvio Padrão

CV: Coeficiente de Variação

Os resultados obtidos em cada diluição da amostra representam a média de nove replicatas.

4.1.2 Exatidão

A exatidão para cada diluição da amostra foi calculada segundo a fórmula a seguir, tendo sido obtidos os resultados apresentados na tabela 3.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

Tabela 3 - Títulos de vírus rábico [log₁₀ DFF₅₀/50µL] determinados pelo método de CIT e % de recuperação obtidas para análise da exatidão do teste

DILUIÇÃO DA AMOSTRA	TÍTULO [log ₁₀ DFF ₅₀ /50µL]		% DE RECUPERAÇÃO	
	ESPERADO	OBTIDO	INDIVIDUAL	X
1/1	4,50	4,47	93,3	96,7
		4,64	103,8	
		4,47	93,3	
1/3,2	4,00	3,94	98,5	102,3
		4,35	108,7	
		4,00	100,0	
1/10	3,50	3,29	94,0	99,7
		3,62	103,4	
		3,57	102,0	
1/32	3,00	2,75	91,7	100,0
		3,24	108,0	
		3,03	101,0	
1/100	2,50	2,44	97,6	101,4
		2,70	108,0	
		2,47	98,8	
1/320	2,00	1,94	97,0	100,4
		2,14	107,0	
		1,95	97,5	
1/1.000	1,50	1,60	106,7	100,4
		1,45	96,7	
		1,47	98,0	
			X =	100,1

X = Média Geométrica

Todas as diluições apresentaram índices de recuperação de 100% ± 15%, estando de acordo com a recomendação da ANVISA.

4.1.3 Precisão intra-ensaio [repetibilidade]

Os resultados das 10 replicatas de cada diluição da amostra, realizadas no mesmo dia para avaliação da repetibilidade do teste de CIT estão na tabela 4. Os CV para as três diluições da amostra variaram de 3,2 a 5,8%.

Tabela 4 - Títulos de vírus rábico [\log_{10} DFF₅₀/50 μ L] determinados pelo método de CIT para avaliação da repetibilidade do teste

REPLICATA Nº	DILUIÇÃO DA AMOSTRA		
	1/1	1/32	1/1.000
1	4,81	3,22	1,59
2	4,95	3,00	1,50
3	4,72	3,22	1,78
4	4,72	3,05	1,50
5	5,12	3,00	1,61
6	4,72	3,22	1,59
7	4,61	3,00	1,50
8	4,61	3,08	1,50
9	4,92	3,05	1,50
10	4,50	3,19	1,50
X	4,76	3,10	1,55
DP	0,19	0,10	0,09
CV [%]	3,9	3,2	5,8

X: Média Geométrica

DP: Desvio Padrão

CV: Coeficiente de Variação

Os títulos obtidos com as amostras diluídas a 1/32 ou 1/1.000 foram normalizados para 100% da concentração da amostra de acordo com as equações:

Amostras diluídas a 1/32: \log (antilog do título x 32)

Amostras diluídas a 1/1.000: \log (antilog do título x 1.000)

Os 30 valores normalizados apresentaram $X = 4,64$; $DP = 0,16$ e $CV = 3,4$, atendendo os critérios de aceitação. A análise de variância demonstrou ainda que não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre esses resultados.

4.1.4 Precisão inter-ensaios [intermediária]

Os coeficientes de variação dos ensaios realizados mudando o material, o operador e o dia de realização variaram de 0 a 10,1% [Tabela 5] e o CV geral de todos os resultados, calculado a partir dos dados normalizados para 100% de concentração da amostra, foi de 4,7% [Tabela 6].

Tabela 5 - Títulos de vírus rábico [\log_{10} DFF₅₀/50 μ L] determinados pelo método de CIT para avaliação da precisão intermediária do teste

DILUIÇÃO	DADOS ESTATÍSTICOS	VARIÁVEL			
		BASE	MATERIAL	OPERADOR	DIA
1/1	X \pm DP	4,67 \pm 0,22	4,83 \pm 0,30	4,68 \pm 0,12	4,50 \pm 0,22
	CV [%]	4,7	6,3	2,7	4,9
1/32	X \pm DP	3,11 \pm 0,07	2,97 \pm 0,30	2,89 \pm 0,17	2,78 \pm 0,11
	CV [%]	2,4	10,1	5,7	3,9
1/1.000	X \pm DP	1,50 \pm 0,00	1,56 \pm 0,15	1,36 \pm 0,06	1,37 \pm 0,11
	CV [%]	0,0	9,5	4,0	8,0

X: Média Geométrica

DP: Desvio Padrão

CV: Coeficiente de Variação

Os resultados obtidos em cada diluição da amostra representam a X de três replicatas.

Após a normalização dos títulos virais das amostras diluídas a 1/32 ou 1/1.000 pelas equações apresentadas no item 4.1.3, foram obtidos os seguintes resultados:

Tabela 6 - Títulos de vírus rábico [\log_{10} DFF₅₀/50 μ L] determinados pelo método de CIT para avaliação da precisão intermediária do teste - Dados normalizados

DILUIÇÃO	VARIÁVEL			
	BASE	MATERIAL	OPERADOR	DIA
1/1	4,67	4,83	4,68	4,50
1/32	4,61	4,47	4,39	4,28
1/1.000	4,50	4,56	4,36	4,37

Os resultados obtidos em cada diluição da amostra representam a média de três replicatas.

A média de todos os valores normalizados foi de 4,52; o desvio padrão de 0,21 e o CV igual a 4,7%, atendo os critérios de aceitação.

A análise de variância demonstrou que não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os resultados obtidos mudando o material, o operador e o dia de realização. Foi possível observar, no entanto, que as amostras mais diluídas foram mais influenciadas por esses fatores, já que para as amostras não diluídas foi obtido $P = 0,40$ enquanto para as amostras diluídas a 1/32 e 1/1.000 o P foi de 0,25 e 0,09, respectivamente.

4.1.5 Influência do tempo entre o descongelamento da amostra e a execução do teste

Os coeficientes de variação dos ensaios realizados com diferentes intervalos de exposição da amostra à temperatura ambiente [18-22 °C] entre a descongelação da mesma e a execução do teste variaram de 1,2 a 2,2% para as três diluições testadas [Tabela 7]. Esses resultados atendem os critérios de aceitação.

Tabela 7 - Títulos de vírus rábico [\log_{10} DFF₅₀/50 μ L] de amostras dosadas por CIT após intervalos variáveis entre o descongelamento e a execução do teste

TEMPO (MINUTOS)	DILUIÇÃO DA AMOSTRA		
	PURA	1/32	1/1.000
0	4,72	3,23	1,81
30	4,82	3,18	1,73
60	4,68	3,30	1,73
90	4,73	3,31	1,75
X	4,74	3,25	1,75
DP	0,06	0,06	0,04
CV [%]	1,2	1,9	2,2

Cada resultado representa a média de duas replicatas

A análise dos 12 valores normalizados pelas equações apresentadas no item 4.1.2 apresentou os seguintes resultados: $X = 4,75$; $DP = 0,05$ e $CV = 1,0$. Esses resultados atendem os critérios de aceitação.

4.1.6 Estabilidade ao congelar e descongelar amostras

Os títulos virais dosados após múltiplos processos de congelamento e descongelamento apresentaram CV entre 2,6 e 9,0% para as três diluições testadas [Tabela 8].

Tabela 8 - Títulos de vírus rábico [\log_{10} DFF₅₀/50 μ L] de amostras dosadas por CIT após múltiplos processos de congelamento e descongelamento

Nº DE CONGELAÇÕES	DILUIÇÃO DA AMOSTRA		
	PURA	1/32	1/1.000
1	4,71	2,86	1,36
2	4,61	3,21	1,50
3	4,72	3,03	1,66
4	4,90	2,77	1,64
5	4,50	2,98	1,50
6	4,80	3,03	1,64
X	4,70	2,98	1,55
DP	0,12	0,19	0,14
CV [%]	2,6	6,5	9,0

Cada resultado representa a média de duas replicatas

Atendendo os critérios para aceitação, a análise dos 12 valores normalizados pelas equações apresentadas no item 4.1.2 apresentou os seguintes valores: X = 4,58; DP = 0,16 e CV = 3,5%.

4.1.7 Resumo dos resultados

Quadro 9 - Resultados obtidos nos ensaios de validação do teste de Titulação do Vírus Rábico [CIT]

PARÂMETRO	CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO	RESULTADOS		CONCLUSÃO
		INDIVIDUAIS	MÉDIAS	
Linearidade	$r > 0,98$	0,9945 – 0,9993	0,9996	Satisfatório
	$CV \leq 20\%$	2,2 – 8,2	xxxxx	Satisfatório
Exatidão	% recuperação = $100 \pm 15\%$	91,7 – 108,7%	100,1%	Satisfatório
Repetibilidade	$CV \leq 20\%$	3,2 – 5,8%	3,4%	Satisfatório
Precisão inter-ensaios	$CV \leq 20\%$	0,0 – 10,1%	4,7%	Satisfatório
Influência do tempo entre o descongelamento da amostra e a execução do teste	$CV \leq 20\%$	1,2 – 2,2%	1,0%	Satisfatório
Estabilidade ao congelar e descongelar amostras	$CV \leq 20\%$	2,6 – 9,0%	3,5%	Satisfatório

4.2 Validação do teste de Soroneutralização de vírus rábico em células BHK-21 [SN em células BHK-21]

4.2.1 Linearidade

Duas abordagens foram utilizadas para avaliar a linearidade do teste: a correlação entre os títulos de anticorpos neutralizantes [ACN] esperados e obtidos e a avaliação do coeficiente de variação para cada diluição da amostra.

4.2.1.1 Coeficiente de correlação

Foram traçadas curvas dose-resposta entre os títulos de ACN esperados e as médias dos títulos obtidos em três dias diferentes e pelas médias de todos os resultados [Figura 4].

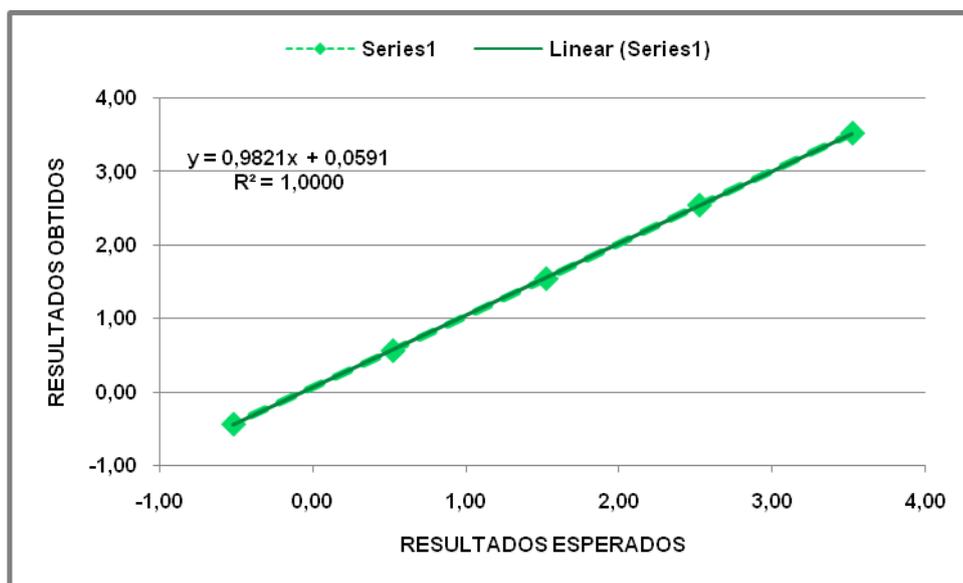


Figura 4 - Dispersão mostrando a correlação entre os títulos de ACN [UI/mL] esperados e médias geométricas obtidas em testes de SN em células BHK-21.

Foram obtidos coeficientes de correlação acima de 0,98 para todas as curvas, conforme quadro a seguir, portanto, aprovados:

Tabela 9 - Coeficientes da regressão linear das curvas de calibração para o teste de SN em células BHK-21

COEFICIENTES DA EQUAÇÃO LINEAR	TESTES			
	1º DIA	2º DIA	3º DIA	MÉDIA
a	0,9990	0,9701	0,9781	0,9821
b	0,0055	0,0732	0,0951	0,0591
r	0,9998	0,9998	0,9999	1,0000

a = coeficiente angular; b = coeficiente linear;
r = coeficiente de correlação

4.2.1.2 Coeficiente de variação

Os coeficientes de variação para todas as diluições testadas ficaram abaixo do limite de aceitação de 20% [Tabela 10].

Tabela 10 - Títulos de ACN [UI/mL] de um lote de soro equino hiperimune [F(ab')₂] determinados pelo método de SN em células BHK21 e coeficientes de variação calculados para análise de linearidade do teste

DILUIÇÃO DA AMOSTRA	TÍTULO (UI/mL)			
	ESPERADO	OBTIDO		
		X	DP	CV %
1/1	3.315	3.315	204,5	6,2
1/10	331	348	27,7	8,0
1/100	33	35	2,9	8,3
1/1.000	3	3,6	0,3	8,4
1/10.000	0,3	0,4	0,1	15,9

X: Média Geométrica
DP: Desvio Padrão
CV: Coeficiente de Variação

4.2.2 Exatidão

A exatidão para cada diluição da amostra de soro foi calculada segundo a fórmula a seguir, tendo sido obtidos os resultados apresentados na tabela 11.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

Tabela 11 - Títulos de ACN [UI/mL] determinados pelo método de SN em células BHK-21 e % de recuperação calculadas para análise da exatidão do teste

DILUIÇÃO DA AMOSTRA	TÍTULO (UI/mL)		% DE RECUPERAÇÃO	
	ESPERADO	OBTIDO	INDIVIDUAL	X
1/1	3.315	3.113	93,9	100,0
		3.322	100,2	
		3.522	106,2	
1/10	331	372	112,4	105,1
		318	96,1	
		356	107,6	
1/100	33	33	100,0	104,8
		33	100,0	
		38	115,2	
1/1.000	3	3,3	100,0	108,8
		3,6	109,1	
		3,9	118,2	
1/10.000	0,3	0,30	100,0	112,9
		0,36	120,0	
		0,36	120,0	
X				106,6

X: Média Geométrica

4.2.3 Precisão intra-ensaio [repetibilidade]

Os resultados das 5 replicatas de cada diluição da amostra, realizadas em um único dia para a avaliação da repetibilidade do teste de SN em células BHK-21 estão na tabela 12. Os CV para as três diluições da amostra variaram de 2,9 a 9,1%.

Tabela 12 - Dosagens do soro referência internacional [UI/mL] em ensaios de SN em células BHK-21 para avaliação da repetibilidade do teste

REPLICATA Nº	DILUIÇÃO DA AMOSTRA		
	1/1	1/10	1/100
1	4045	371	34
2	4249	369	39
3	3925	398	44
4	4107	374	40
5	4107	411	40
X	4085	384	39
DP	117	19	4
CV [%]	2,9	4,9	9,1

X: Média Geométrica

DP: Desvio Padrão

CV: Coeficiente de Variação

Os títulos de ACN obtidos com as amostras diluídas a 1/10 ou 1/100 foram normalizados para 100% da concentração da amostra de acordo com as equações:

Amostras diluídas a 1/10: Título x 10

Amostras diluídas a 1/100: Título x 100

A análise dos 30 valores normalizados apresentou os seguintes resultados: X = 3950; DP = 247 e CV = 6,3.

Todos os resultados atenderam os critérios de aceitação.

A análise de variância demonstrou que não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre todos os resultados normalizados

4.2.4 Precisão inter-ensaios [intermediária]

Os ensaios realizados com dois operadores apresentaram um CV de 5,5% [Tabela 13] e os ensaios variando o dia de execução do teste, um CV de 5,1% [Tabela 14].

Tabela 13 - Dosagens do soro referência internacional [em DE₅₀*] obtidas em ensaios de SN em células BHK-21 com dois operadores

DIA	OPERADOR	
	1	2
A	2648	2636
B	2722	2782
C	2449	2427
X dos 6 resultados		2607
DP dos 6 resultados		144
CV [%] dos 6 resultados		5,5

X: Média Geométrica

DP: Desvio Padrão

CV: Coeficiente de Variação

*DE₅₀ = Diluição capaz de neutralizar a formação de focos fluorescentes em 50% dos campos observados

A análise estatística dos resultados obtidos pelos dois operadores [teste t “Student”] demonstrou que não houve diferença significativa entre os mesmos [ts=0,77 < tc=4,30], com nível de confiança de 95%.

Tabela 14 - Dosagens do soro referência internacional [em DE₅₀] obtidas em ensaios de SN em células BHK-21 por um único operador em dias diferentes

DIA	DE ₅₀
A	2631
B	2828
C	2668
D	2538
E	2722
F	2740
G	2759
H	2449
I	2970
J	2654
X	2692
DP	139
CV [%]	5,1

X: Média Geométrica

DP: Desvio Padrão

CV: Coeficiente de Variação

4.2.5 Estabilidade ao congelar e descongelar amostras

As DE₅₀ do soro referência internacional dosadas após um número variado de congelações apresentaram CV de 11,7%, atendendo os critérios de aceitação. A distribuição dos dados foi normal [média não difere da mediana] e a análise de variância [ANOVA] demonstrou que não houve diferença significativa entre as DE₅₀ obtidas após nove processos de congelamento e descongelamento de amostra, com $P=0,51$.

Tabela 15 - Dosagens do soro referência internacional [em DE₅₀] em ensaios de SN em células BHK21 após vários processos de congelamento e descongelamento do mesmo

Nº DE CONGELAÇÕES	TESTE		
	1º	2º	3º
1	2151	2247	2431
2	2808	2371	2703
3	2349	2422	2862
4	2020	2084	2891
5	2288	2002	2341
6	2472	2709	2367
7	2724	2828	2296
8	2050	2710	2124
9	2064	2449	2535
X dos 27 resultados			2403
DP dos 27 resultados			280
CV [%] dos 27 resultados			11,7
Distorção			0,191

X: Média Geométrica

DP: Desvio Padrão

CV: Coeficiente de Variação

4.2.6 Resumo dos resultados

Quadro 10 - Resultados obtidos nos ensaios de validação do teste de SN do vírus rábico em Células BHK-21

PARÂMETRO	CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO	RESULTADOS		CONCLUSÃO
		INDIVIDUAIS	MÉDIAS	
Linearidade	$r > 0,98$	0,9998 – 0,9999	1,0000	Satisfatório
	$CV \leq 20\%$	6,2 – 15,9	xxxxx	Satisfatório
Exatidão	% de recuperação = $100 \pm 15\%$	93,9 – 120,0%	106,3%	Satisfatório
Repetibilidade	$CV \leq 20\%$	2,9 – 9,1%	6,3%	Satisfatório
Precisão inter-ensaios	$CV \leq 20\%$	5,1 – 5,5%	xxxxx	Satisfatório
Estabilidade ao congelar e descongelar amostras	$CV \leq 20\%$	xxxxx	11,7%	Satisfatório

4.3 Estudo da imunogenicidade da vacina contra raiva com diferentes esquemas de imunização

4.3.1 Análise da produção de anticorpos neutralizantes [ACN] em camundongos submetidos a três esquemas de imunização por via intraperitoneal [IP]

A eficiência dos três esquemas em que foi utilizada exclusivamente a via intraperitoneal foi avaliada através da dosagem dos títulos de ACN presentes nos soros dos camundongos imunizados segundo os esquemas I, II e III. As médias geométricas dos títulos obtidos nas sangrias dos dias 50, 78 e 106 podem ser vistos no gráfico que se segue.

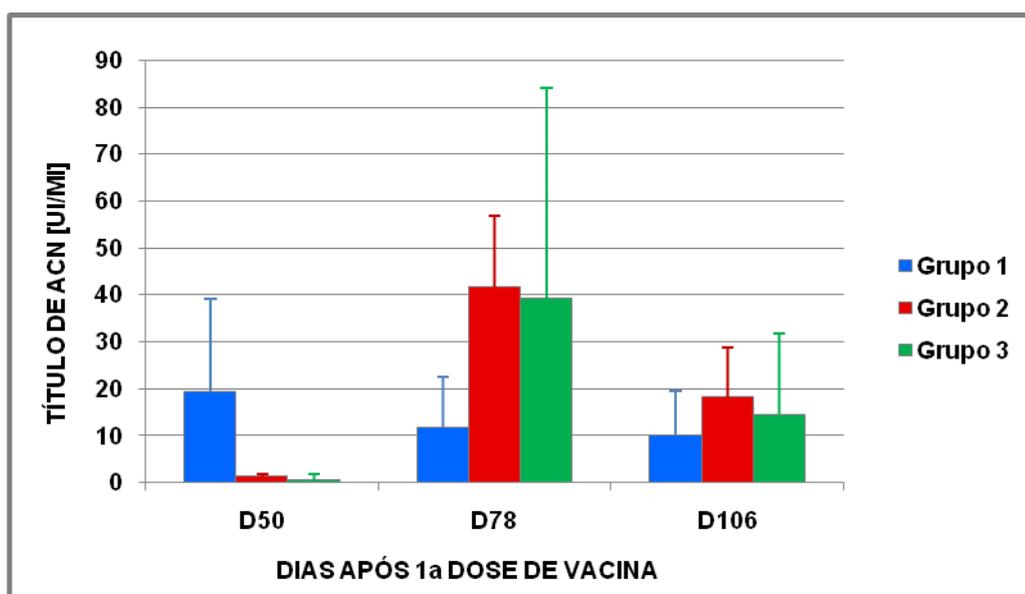


Figura 5 - Médias dos títulos de ACN de camundongos imunizados com vacina contra raiva por via intraperitoneal. Grupo I: Três doses de vacina nos dias 0, 7 e 28; **Grupo II:** Duas doses de vacina nos dias 0 e 60; **Grupo III:** Duas doses nos dias 0 e 60 com vacina diluída 1/10 na 1ª dose e não diluída na 2ª.

4.3.1.1 Efeito do número de doses de vacina e do intervalo entre as mesmas na produção de ACN

A influência do número de doses de vacina administrados e do intervalo entre as mesmas foi avaliada pela comparação de dois esquemas de imunização por via IP. O primeiro grupo recebeu três doses nos dias 0, 7 e 28 e o Grupo II, 2 doses nos dias 0 e 60. As dosagens de ACN realizadas nos 50^o, 78^o e 106^o dias demonstraram que todos os camundongos, independente do esquema de imunização, apresentaram títulos de ACN satisfatórios [$\geq 0,5$ UI/mL] em todas as sangrias [Quadro 11]; entretanto, ao final da imunização [D78] foram obtidos títulos significativamente mais elevados seguindo o esquema II, de apenas duas doses e intervalos maiores entre as mesmas [$P < 0,05$, com nível de confiança de 95%].

4.3.1.2 Efeito da concentração vacinal na produção de ACN

Para analisar o efeito da concentração da vacina na resposta imune humoral comparamos os níveis de ACN produzidos em dois grupos de camundongos [grupos II e III] que receberam duas doses de vacina via IP com o mesmo intervalo [0 e 60 dias], mas em concentrações diferentes. Os camundongos do grupo II receberam 2 doses de vacina não diluída [100%] enquanto os do grupo III receberam a primeira dose da vacina com apenas 10% da concentração e a 2^a dose com 100%.

Para análise da cinética de produção de ACN, sangrias exploradoras foram realizadas no 50^o dia após a 1^a dose e 18 e 46 dias após o reforço.

Os títulos de ACN foram semelhantes em todas as sangrias nos dois grupos [Figura 6]. Entretanto, na resposta primária observou-se que apenas 67% dos camundongos que receberam a vacina menos concentrada apresentaram títulos de ACN satisfatórios [$\geq 0,5$ UI/mL] contra 100% dos que receberam a vacina mais concentrada [Quadro 11]. Já na resposta secundária todos os animais apresentaram títulos de ACN $\geq 0,5$ UI/mL.

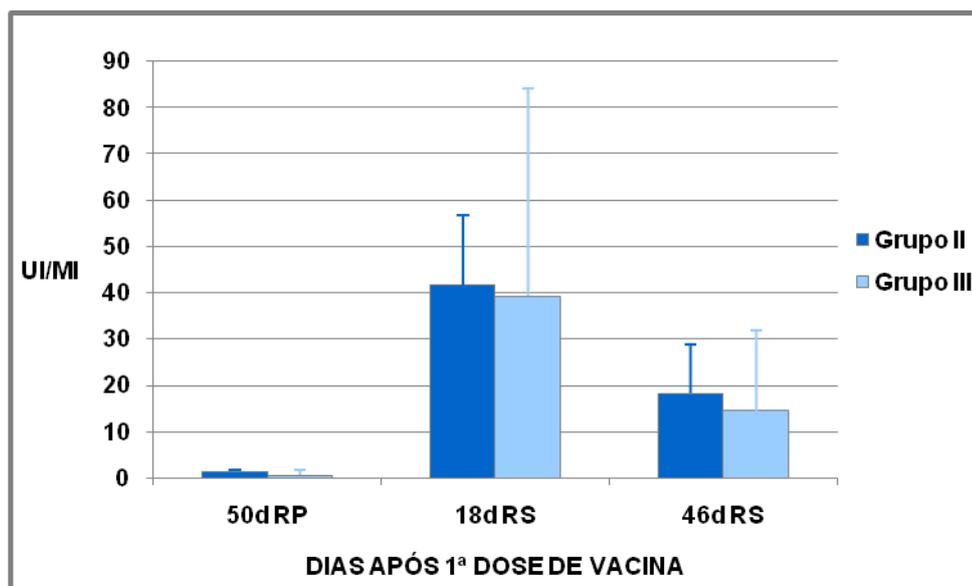


Figura 6 - Cinéticas da produção de ACN de camundongos imunizados com diferentes concentrações de vacina contra raiva.

Dois grupos de camundongos receberam duas doses via IP nos dias 0 e 60, sendo que o **Grupo II** recebeu vacina não diluída nas duas doses e o **grupo III** recebeu vacina diluída a 1/10 na 1ª dose e não diluída na 2ª. As dosagens de ACN foram realizadas no 50º dia da resposta primária e nos 18º e 46º dias da resposta secundária e expressam a média geométrica das dosagens individuais dos camundongos.

Quadro 11 - Taxas de soroconversão [%] dos camundongos submetidos a três esquemas de imunização contra raiva

GRUPO	D50	D78	D106
I	100	100	100
II	100	100	100
III	67	100	100

Grupo I: Três doses de vacina nos dias 0, 7 e 28;

Grupo II: Duas doses de vacina nos dias 0 e 60;

Grupo III: Duas doses nos dias 0 e 60 com vacina diluída a 10% na 1ª dose e não diluída na 2ª.

Soroconversão: títulos de ACN $\geq 0,5$ UI/mL.

4.3.2 Análise da produção de ACN em camundongos submetidos a dois esquemas de imunização por via oral [VO]

Para analisar a influência da via oral na resposta imune humoral, dois grupos de camundongos [IV e V] receberam duas doses de vacina contra raiva com intervalo de 60 dias, sendo a primeira dose administrada por VO e a segunda por via IP. Na 1ª dose os camundongos do grupo IV receberam vacina pura e os do grupo V, vacina adsorvida/encapsulada à sílica nanoestruturada SBA-15.

Os camundongos do Grupo IV não apresentaram qualquer resposta de ACN [$<0,1$ UI/mL] em qualquer das sangrias realizadas nos dias 7, 50, 78 e 106 após a primeira dose de vacina. Por outro lado, todos os animais do Grupo V apresentaram algum nível de ACN no 7º dia da resposta primária, sendo que dois continuaram apresentando níveis detectáveis nas sangrias dos dias 50, 78 e 106 [Figura 7].

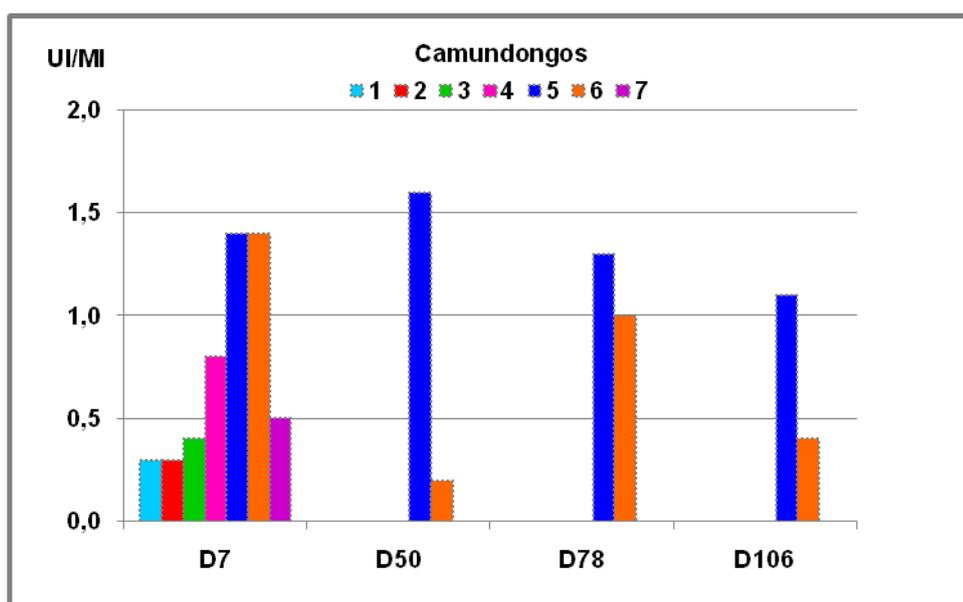


Figura 7 - Títulos de ACN de camundongos imunizados por VO com vacina contra raiva adsorvida a SBA-15. Dosagens realizadas por SN em células BHK-21 7, 50, 78 e 106 dias após a primeira dose de vacina.

5 DISCUSSÃO

A validação de um método objetiva demonstrar que o mesmo é apropriado para a finalidade pretendida, garantindo por meio de estudos experimentais que o método atende às exigências das aplicações analíticas e assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA 2003). O teste de titulação de vírus rábico em células BHK-21 [CIT] é utilizado para monitoramento das diversas fases de produção de vacina contra raiva em culturas de células, além de fazer parte do controle do teste de soroneutralização [SN] em células BHK-21. Dessa forma a validação do CIT é necessária para a validação da SN em células. Utiliza-se o CIT para monitoramento de suspensões de vírus rábico em células no Instituto Butantan desde 1997, após um estudo comparativo que demonstrou boa correlação entre os resultados obtidos com esse teste e a titulação em camundongos [dados não publicados]; carecia, entretanto, um estudo de validação formal do CIT. Por ser um teste quantitativo, utilizado para avaliação de potência, analisaram-se o grau de variabilidade do método através da precisão intra e inter-ensaios, da linearidade, da exatidão e da robustez para alguns quesitos considerados importantes.

A precisão, avaliada pelos índices de CV, ficou demonstrada pelos valores obtidos abaixo de 11%, refletindo um resultado excelente se comparado à citação da WHO (1997a) de que os ensaios em células podem apresentar variabilidade acima de 50%. A linearidade do teste na faixa analisada, entre $10^{1,50}$ e $10^{4,50}$ foi demonstrada pelos coeficientes de correlação obtidos nos três testes realizados, que variaram de 0,9945 a 0,9996. Esses resultados estão de acordo com a ANVISA (2003) que estabelece como critério mínimo aceitável um coeficiente de correlação linear de 0,98 para métodos bioanalíticos. O mesmo ocorreu com a exatidão, cujo desvio variou de 91,7% a 108,7%, sendo que o limite recomendado pela ANVISA (2003) é de $100 \pm 15\%$.

A robustez foi analisada para duas variáveis importantes no teste:

- Ao realizar a titulação de várias amostras, as mesmas podem ficar descongeladas [abaixo da temperatura de manutenção $\leq -70^{\circ}\text{C}$] por tempo variável, até que a última amostra seja diluída e todas sejam adicionadas às células BHK-21. Foi testada a influência do tempo de exposição de até 90 minutos à temperatura ambiente [18 a 22°C] quando dos testes na Seção de Controle Biológico do Instituto

Butantan. Os resultados obtidos, de 1,2 a 2,2% de CV comprovaram que a exposição da amostra por até 90 minutos a essa temperatura não afeta significativamente os resultados.

- Após a execução do teste de CIT, as amostras são re-congeladas e descongeladas em outra ocasião para repetição dos testes. Ao analisar a influência dos processos de múltiplas congelações, observamos que houve uma variação de títulos virais [entre 2,6 e 9,0%] comparável com a precisão do teste [de até 10,1%], e que essa variação não indicou perda de potência viral após cada congelamento.

O objetivo da validação do teste de SN do vírus rábico em células BHK-21 é fornecer elementos para a substituição do teste de SN em camundongos, ainda realizado no Instituto Butantan para determinação da potência do soro anti-rábico heterólogo produzido nesse instituto. Não há dúvidas quanto às vantagens de se substituir um teste realizado *in vivo* por outro *ex vivo*, seja por não infligir sofrimento aos animais, seja porque os testes em células são reconhecidamente menos variáveis e mais rápidos. Porém, como o teste de SN em células BHK-21 não consta da Farmacopéia Brasileira (2004), para que se possa adotá-lo há necessidade legitimá-lo demonstrando a confiabilidade e a relevância do método.

Foram analisadas a precisão intra e inter-ensaios, exatidão e linearidade.

A precisão ficou demonstrada pelos CV observados abaixo de 10%, semelhantes aos obtidos em ensaios de ligação que, segundo a WHO (1997a) tipicamente apresentam variabilidade de 5 a 20%. A linearidade do teste na faixa analisada, entre 0,3 e 3.300 UI/mL foi demonstrada pelos coeficientes de correlação entre 0,9998 e 0,9999 obtidos nos três testes realizados e a exatidão cujo desvio variou de 93,9% a 120,0%, com média de 106,2%. Esses valores foram semelhantes aos obtidos para o teste de SN em células BHK-21 com Moura et al. (2008), com precisão intra e inter-ensaios variando de 11,6 a 22,0%; coeficiente de correlação (linearidade) = -0,97 e exatidão de -0,70.

Assim como para o CIT, foi analisada a robustez para um quesito importante da SN em células:

- O soro de referência internacional utilizado é reconstituído em 1 mL de água destilada conforme as instruções do fabricante [Bio-Rad], aliquotado em frascos de 100 µL e armazenado em freezer a -70 °C. No momento do uso, um frasco é descongelado, retira-se 10 µL do soro para o teste e, novamente, armazena-se no

freezer. Dessa forma, cada frasco contendo 100 μ L é utilizado nove vezes. A análise de variância e o CV observado nos 30 ensaios realizados demonstraram que esses múltiplos processos de congelação não afetaram significativamente a DE₅₀ do soro referencial.

Uma das maiores dificuldades para validação dos métodos de CIT e SN em células foi estabelecer os critérios de aceitação uma vez que não há limites determinados para esse tipo de teste. Os níveis de confiança e relevância necessários dependem das condições sob as quais o teste é realizado e para que fins os resultados serão utilizados (Robinson, 2003). Para analisar a confiança de um teste de ligação como EIA, Ark et al. (2000) e Jacobson (1998) adotaram um limite de variação de 20%. Os limites de aceitação de 20% adotados nesse trabalho para os coeficientes de variação foram baseados nas observações dos testes realizados anteriormente no Instituto Butantan.

O desenvolvimento de vacinas tem progredido rapidamente fazendo com que um número cada vez maior de doenças seja passível de prevenção. Espera-se que essas sejam inócuas e potentes a ponto de imunizar eficazmente numa única dose, de fácil aplicação [preferencialmente administráveis pela via oral], de baixo custo, estáveis e, sobretudo, capazes de promover memória imunológica eficiente.

Para avaliar a eficácia de uma vacina faz-se necessário a consideração de fatores como suas propriedades imuno/antigênicas, concentração e via de administração, número de doses e intervalo entre as mesmas, necessidade e emprego de adjuvantes e, no caso das vacinas orais, o ambiente gastrointestinal e a forma de apresentação epitópica (Shalaby, 1995; Takashi et al., 2009). No caso específico da vacina contra raiva, o caráter letal da doença, o fato de que em certas ocasiões essa deve ser utilizada para tratamento de pessoas já infectadas pelo vírus, para promover uma resposta imune rápida antes que a doença se desenvolva e, levando em conta o histórico das primeiras vacinas aplicadas em grande número de doses diárias, há receio em se alterar os esquemas de imunização preconizados.

As vacinas produzidas em cérebros de animais, e que causavam grande número de efeitos adversos graves, eram utilizadas apenas em pessoas agredidas por animais suspeitos da doença ou em trabalhadores expostos ao risco da doença. As novas vacinas em culturas de células, por serem muito mais seguras, poderiam ser aplicadas preventivamente em populações de regiões onde a raiva é endêmica,

sendo essa uma recomendação da WHO (2007). Nesses casos é preciso procurar o esquema mais eficiente em termos de soroconversão com o menor número de doses e, principalmente, persistência da imunidade.

Estudos anteriores realizados no Instituto Butantan sobre a imunogenicidade de toxinas tetânica e diftérica em camundongos, nos quais se variaram as concentrações das doses, os adjuvantes e os intervalos entre as imunizações indicam claramente que o aumento no intervalo entre as duas primeiras doses promove um aumento significativo dos níveis de anticorpos específicos naquela espécie (Quintílio et al., 2009). Resultados semelhantes foram obtidos com a vacina contra raiva em camundongos N:NIH (Mourão Fuches, 2003) e em macacos Rhesus (Espíndola, 2005), demonstrando que um esquema de imunização com intervalos mais longos propicia uma resposta secundária bem mais elevada além de indicar uma melhor duração dos níveis de anticorpos produzidos. Com base nesses dados, no presente estudo foram avaliados esquemas de imunização variando concentração e número de doses, o intervalo entre as mesmas e duas vias de inoculação.

Comparando os resultados obtidos nos esquemas em que foi utilizada a via IP, com três doses nos dias 0, 7 e 28 [Grupo I] ou duas doses nos dias 0 e 60 [Grupo II] observamos que o maior espaçamento entre as doses levou à produção de um nível de ACN significativamente mais elevado após a segunda dose de vacina. Deduz-se, também, que o maior intervalo entre as doses permitiu um contato apropriado do antígeno com as células do sistema imune, especialmente linfócitos B, nos centros germinativos. Após cada estímulo antigênico, parte dos linfócitos B específicos para o antígeno, estimulados por células T_H nos centros germinativos, é submetida a ciclos repetidos de hipermutações somáticas. Esses clones de células B são selecionados pela afinidade ao antígeno. Algumas células resultantes dessa seleção sofrem mudança de classe de isótipo e se diferenciam em plasmócitos, enquanto outros permanecem como células de memória.

A influência da concentração vacinal na resposta imune humoral foi evidenciada pelos resultados obtidos com o grupo III, onde foi usada a vacina 10 vezes diluída na 1ª dose. Apesar da baixa concentração de antígeno, já na resposta primária todos os camundongos apresentaram algum nível de ACN [$\geq 0,2$ UI/mL], embora nem todos satisfatórios. A similaridade dos níveis de ACN obtidos em todas

as sangrias com o grupo II, que recebeu o mesmo número de doses de vacina, mas em concentração normal, demonstra que podemos estar administrando um excesso de antígeno, o que pode não ser a melhor estratégia para obter uma imunização eficaz e duradoura.

A imunização por via oral é a mais conveniente pela praticidade de aplicação, melhor aceitação da população, menor número de efeitos adversos, principalmente locais, e por não necessitar de materiais como seringas e agulhas nem de pessoal treinado para aplicação parenteral. Entretanto, nem todas as vacinas podem ser administradas por essa via, pois a acidez elevada e a ação de proteases do trato gastrointestinal podem desnaturar os antígenos ou alterar a estrutura de seus epítomos. Há ainda a possibilidade de indução de tolerância dependendo da concentração, da dose administrada, do intervalo entre as imunizações e do uso de adjuvantes (Shalaby, 1995). A adsorção/encapsulação da vacina contra raiva em células Vero em SBA-15 teve por objetivo protegê-la das condições ácidas adversas do trato gastrointestinal, de forma a hipoteticamente evitar a desnaturação dos epítomos imunodominantes, mantendo suas propriedades imunogênicas até sua ligação com as células M, responsáveis pela captura de antígenos na luz intestinal e ativação das células do sistema imune.

Com a imunização dos camundongos por via oral, sem adjuvante [Grupo IV], não houve resposta detectável de anticorpos, mesmo após a dose de reforço via IP; portanto, além da provável destruição dos determinantes imunogênicos na ausência de adjuvante, pode-se supor que deva ter ocorrido a indução de tolerância. Essa hipótese poderá ser investigada e estudos futuros, administrando-se um imunógeno não relacionado por via intraperitoneal. Já os animais que receberam a vacina adsorvida/encapsulada na sílica SBA-15 demonstraram um resultado bem diferente: todos apresentaram algum nível de ACN na resposta primária $\geq 0,3$ UI/mL. Esses anticorpos, porém foram pouco duradouros, fenômeno observado em imunizações por via oral (Shalaby, 1995) e somente dois dos sete camundongos continuaram apresentando níveis protetores nas sangrias subseqüentes. Esses resultados são promissores se comparados aos obtidos com a vacina administrada por via oral sem o SBA-15 e comprovam o papel adjuvante da sílica nanoestruturada SBA-15. Novos estudos utilizando o SBA-15 poderão ajudar no estabelecimento de uma estratégia

para a utilização da via oral para a vacinação contra raiva, assim como para outros imunógenos.

Assim, em seu conjunto, para a vacina anti-rábica os resultados obtidos ao longo dos últimos 10 anos, indicam que a diminuição da dose, especialmente a primeira, e o aumento no intervalo dessa para a segunda, promove um aumento altamente significativo dos níveis de anticorpos aos diferentes antígenos e, em estudos anteriores, demonstraram a melhora da resposta de indivíduos constitutivamente maus respondedores. Esses dados sugerem a participação dos seguintes segmentos da resposta imune no aumento da produção de anticorpos aos imunógenos:

- Melhoria da apresentação antigênica.
- Aumento qualitativo do reconhecimento epitópico.
- Melhoria da memória imunológica – células B e T_H.
- Prevenção de deleção clonal – linfócitos T_H e CTL.

Tendo por base esses diferentes aspectos e as relações patógeno - hospedeiro, está sendo desenvolvida uma Teoria sobre *Seleção de Patogenicidade e Resistência a Infecções* (Sant'Anna et al., 2006). Essa parte do princípio de que todas essas atividades são reguladas independentemente e por poligenes. Assim, para uma população de mamíferos geneticamente heterogêneos dever-se-ia administrar uma dada vacina seguindo esquemas que, além de proteção, possibilitasse o desenvolvimento de memória efetiva. Ressalte-se que, a grande maioria dos protocolos de imunizações foram instituídos quando pouco sabia-se sobre aspectos imunogenéticos ou de mecanismos de resistência, e os interesses econômicos envolvidos na comercialização de vacinas eram menos agressivos. Além de fatores constitutivos inatos é também evidente a importância de fatores ambientais condicionantes de más respostas, como condições de subnutrição, de insalubridade, de contaminação. A vacinação ineficaz do ponto de vista qualitativo e quantitativo passaria a agir como agente seletivo para as várias características de um dado patógeno ou, mais ainda, para características de microrganismos semelhantes que compartilham repertórios antigênicos e que competem entre si. Assim, as virulência, disponibilidade de receptores, toxicidade, infectividade, características quantitativas

que seriam moduladas pela ineficiência de células e moléculas do sistema imune em controlar ou neutralizar o agente infeccioso. E vale lembrar que não há doença infecciosa erradicada, mas sim controlada.

6 CONCLUSÕES

6.1 O teste de titulação de vírus rábico em células BHK-21 [CIT] apresentou linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e especificidade satisfatórias. Ficou demonstrado também que o tempo entre a descongelação da amostra e a execução do teste, com um limite de 90 minutos, tem pouco efeito sobre os resultados do teste. O mesmo se concluiu em relação à influência de até seis processos de congelação e descongelação da amostra de suspensão viral analisada para o lote testado.

6.2 O teste de soroneutralização de vírus rábico em células BHK-21 apresentou linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e especificidade satisfatórias além de ficar demonstrado que até 9 processos de congelação e descongelação do soro referência não afetam significativamente os resultados do teste.

6.3 Os títulos de ACN obtidos com a imunização de camundongos via IP demonstraram que a imunização com intervalos maiores entre as doses é mais eficiente, possibilitando inclusive a redução do número de doses aplicadas.

6.4 A administração de concentrações reduzidas de antígeno na 1ª dose promoveu uma memória imunológica eficiente, com a indução de uma resposta secundária semelhante à obtida com o antígeno mais concentrado.

6.5 Embora a administração da vacina contra raiva via oral, sem adjuvantes não tenha induzido a uma resposta de anticorpos e ainda tenha levado à supressão da resposta secundária por via IP, a sílica mesoporosa nanoestruturada SBA-15 protegeu em parte a vacina, permitindo que os antígenos estimulassem a resposta imune no trato gastrointestinal, comprovando a aplicabilidade desse material como adjuvante de vacinas orais.

REFERÊNCIAS*

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução-RE Nº 899, de 29 de maio de 2003

Arai YT, Kimura M, Sakaue Y, Hamada A, Yamada KI, Nakayama M, Takasaki T, Kurane I. Antibody responses induced by immunization with a japanese rabies vaccine determined by neutralization test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Vaccine*. 2002;20:2448-53.

Ark A, Kappelli IS, Ólander Rm, Enssle K, Jadhav S, Donk H, Hendriksn CFM. The pertussis serological potency test collaborative study to evaluate replacement of the mouse protection test. *Biologicals*. 2000;28:105-18.

Ashwathnarayana DH, Madhusudana SN, Sampath G, Sampathy DM, Mankeshwar Ravish HH, Ullas PT, Behra TR, Sudarshan MK, Gangaboraiah, Shamanna M. A comparative study on the safety and immunogenicity of purified duck embryo cell vaccine (PDEV, Vaxirab) with purified chick embryo cell vaccine (PCEC, Rabipur) and purified vero cell rabies vaccine (PVRV, Verorab). *Vaccine*. 2009;28(1):148-51.

Aubert MFA. Methods for the calculation of titres. In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H, editors. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. Geneva: WHO; 1996. Appendix 3. P. 445-59.

Badrane H, Bahloul C, Perrin P, Tordo N. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *J Virol*. 2001;75:3268-76.

Baer GM. The oral rabies immunization of foxes and dogs with sausage baits. *Dev Biol Stand*. 1976;33:417-23.

Benko S, Magyarics Z, Szabo A, Rajnavolgyi E. Dendritic cell subtypes as primary targets of vaccines: the emerging role and cross-talk of pattern recognition receptors. *Biol Chem*. 2008;389:469-85.

Berek C, Milsten C. The dynamic nature of the antibody repertoire. *Immunol Rev*. 1988;105:5-23.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to *Biomedical Journal*: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2004 May 06].

Berlin BS, Mitchell JR, Burgoyne GH, Oleson D, Brown WE, Goswick C, Mccullough NB. Rhesus diploid rabies vaccine (adsorbed): a new rabies vaccine. Results of initial clinical studies of pre-exposure vaccination. *JAMA*. 1982;247:1726-8.

Biozzi G, Mouton D, Sant'Anna OA, Passos HC, Gennari M, Reis MH, Ferreira VC, Heumann AM, Bouthillier Y, Ibañez OM, Stiffel C, Siqueira M. Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in the mouse. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1979;85:31-98.

Black JG, Lawson KF. The safety and efficacy of immunizing foxes (*Vulpes vulpes*) using bait containing attenuated rabies virus vaccine 1980. *Can J Comp Med*. 1980 Apr;44(2):169-76.

Briggs DJ, Schwenke JR. Longevity of rabies antibody titers in recipients of human diploid cell rabies vaccine. *Vaccine*. 1992;10:125.

Bruckner L, Cussler K, Halder M, Barrat J, Castle P, Duchow K, Gatewood DM, Gilbert R, Groen J, Knapp B, Levis R, Milne C, Parker S, Stünkel K, Visser N, Volkens P. Three Rs approaches in the quality control of inactivated rabies vaccines. *Altern Lab Anim*. 2003;31:429-54.

Burgoyne GH, Kajiya KD, Brown DW, Mitchell JR. Rhesus diploid rabies vaccine (adsorbed): a new rabies vaccine using FRhI-2 cells. *J Infec Dis*. 1985;152:204-10.

Carvalho LV. Estudo experimental do efeito adjuvante da sílica nanoestruturada SBA-15 [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

Cenna J, Tan GS, Papaneri AB, Dietzschold B, Schnell MJ, et al. Immune modulating effect by a phosphoprotein-deleted rabies virus vaccine vector expressing two copies of the rabies virus glycoprotein gene. *Vaccine*. 2008;26:6405-14.

Charlton KM. The pathogenesis of rabies and other lyssaviral infections: recent studies. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994;187:95-119.

Council of Europe. Analytical Validation In: *Pharmeuropa Technical Guide*. Strasbourg. Council of Europe, 1996;28-40.

Council of Europe. Human rabies immunoglobulin (Monograph N° 0723). In: *The European Pharmacopoeia*, 5th ed. Strasbourg, France. 2005;1750-1

Cross ML, Bুদ্ধle BM, Aldwell FE. The potential of oral vaccines for disease control in wildlife species. *Vet J.* 2007;174(3):472-80.

Darling AJ, Boose JA, Spaltro J. *Virus Assay Methods: Accuracy and Validation.* Biologicals. 1998;26:105-10.

Departamento de Vigilancia Epidemiologica. Protocolo para tratamento de raiva humana no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde.* 2009;18(4):385-94.

Dodet B, Adjogoua EV, Aguemon AR, Amadou OH, Atipo AL, et al. Fighting rabies in Africa: the Africa Rabies Expert Bureau (AfroREB). *Vaccine.* 2008;26:6295-8.

Espindola CPM. Resposta imunológica de macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) à vacina anti-rábica produzida em células Vero, segundo diferentes esquemas de imunização [tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo (Brasil): Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT; 2005.

Estrada R, Vos A, De Leon R, Mueller T. Field Trial with oral vaccination of dogs against rabies in the Philippines. *BMC Infect Dis.* 2001;1:23.

Faber M, Li J, Kean RB, Hooper DC, Alugupalli KR, et al. Effective preexposure and postexposure prophylaxis of rabies with a highly attenuated recombinant rabies virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:11300-5.

Fangtao L, Fazhen Z, Longmu L, Xiauzeng L, Rongfang Z, Yongzin Y, Naimin C. The primary hamster kidney cell rabies vaccine: Adaptation of virus strain, production of vaccine and pre and post-exposure treatment. *J Infect Dis.* 1983;467-73.

Farmacopéia Brasileira, parte II, Quinto fascículo: Soro Anti-Rábico. Monografia 109. 4ª ed. São Paulo: Atheneu; 2004.

Farnaud S. The evolution of the Three Rs. *Altern Lab Animal.* 2009;37(3):249-54.

Favoretto SR, Carrieri ML, Tino MS, Assis A, Zanetti CR, Pereira OA. Reduced schedule of human anti-rabies immunization with Fuenzalida and Palacios vaccine. Additional data. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1993;35:281-4.

Fermi C. Über die immuunisierung gegen wutkrankheit. *Z Hyg Infectionskrankh.* 1908;58:233-76.

Fishbein DB, Yenne KM, Dressen DW, Teplis CF, Mehta N, Briggs DJ. Risk factors for systemic hypersensitivity reactions after booster vaccinations with human diploid cells rabies vaccine: A nationwide prospective study. *Vaccine*. 1993;11:1390-4.

Frazatti-Gallina NM, Mourão-Fuches RM, Paoli RL, Silva MLN, Miyaki C, Valentini EJJ, Raw I, Higashi HG. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. *Vaccine*. 2004;23:511-7.

Frazatti-Gallina NM. Desenvolvimento de uma vacina contra a raiva em células Vero, cultivadas em meio livre de soro. Estudo da imunidade humoral e celular induzida por essa vacina [tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo (Brasil): Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT; 2005.

Fuenzalida E, Palacios R. Un método mejorado en la preparación de la vacuna antirabica. *Bol Inst Bact Chile*. 1955;8:3-10.

Gaudin Y, Tuffereau C, Durrer P, Brunner J, Flamand A, Ruigrok R. Rabies virus-induced membrane fusion. *Mol Membr Biol*. 1999;16:21-31.

Gispen R, Schmittmann GJP, Saathof B. Rabies vaccine derived from suckling rabbit brain. *Arch ges Virusforsch*. 1965;15:366-76.

Gupta PK, Sharma S, Walunj SS, Chaturvedi VK, Raut AA, et al. Immunogenic and antigenic properties of recombinant soluble glycoprotein of rabies virus. *Vet Microbiol*. 2005;108:207-14.

Hammami S, Schumacher C, Cliquet F, Tlatli A, Aubert A, Aubert M. Vaccination of Tunisian dogs with the lyophilized SAG2 oral rabies vaccine incorporated into the DBL2 dog bait. *Vet Res*. 1999;30:607-13.

Hemachudha T, Laothamatas J, Rupprecht CE. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and a diagnostic challenge. *Lancet Neurol*. 2002;1:101-9.

Hendriksen CFM. Validation of tests methods in the quality control of biological. *Dev. Biol. Stand*. 1999;101:217-21.

International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1). 2005.

Jackson AC. Update on rabies diagnosis and treatment. *Curr Infect Dis Rep.* 2009;11(4):296-301.

Jacobson, RH. Validation of serological assay for diagnosis of infectious diseases. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 1998;17(2):469-86.

Klein J, Capen R, Mancinelli R, Robinett R, Pietrobon PJF, Quinn J, Schofield T. Validation of Assays for Use with Combination Vaccines. *Biologicals.* 1999;27:35-41.

Kondo A, Takashima Y, Suzuki M. Inactivated rabies vaccine of chick embryo cell culture origin. *Symp Series Immunobiol Stand.* 1974;21:182-9.

Kresge CT, Leonowicz ME, Roth WJ, Vartuli JC, Beck JS. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature.* 1992;359:710-2.

Kuzmin IV, Mayer AE, Niezgoda M, Markotter W, Agwanda B, Breiman RF, Rupprecht CE. Shimon bat virus, a new representative of the Lyssavirus genus. *Virus Res.* 2010;149(2):197-210.

Lanzavecchia A, Sallusto F. Human B cell memory. *Curr Opin Immunol.* 2009;21:298-304.

Lafon M. Rabies virus receptors. *J Neurovirol.* 2005;11:82-7.

Li Z, Feng Z, Ye H. Rabies viral antigen in human tongues and salivary glands. *J Trop Med Hyg.* 1995;98:330-2.

Loza-Rubio E, Rojas E, Gomez L, Olivera MT, Gomez-Lim MA. Development of an edible rabies vaccine in maize using the Vnukovo strain. *Dev Biol (Basel).* 2008;131:477-82.

Lyng J, Bentzon MW, Fitzgerald EA. Potency assay of antibodies against rabies. A report on a collaborative study. *J Biol Stand.* 1989;17(3):267-80.

Lyons A, Longfield J, Kuschner R, Straight T, Binn L, et al. A doubleblind, placebo-controlled study of the safety and immunogenicity of live, oral type 4 and type 7 adenovirus vaccines in adults. *Vaccine.* 2008;26:2890-8.

Matos JR, Mercuri LP, Kruk M, Jaroniec M. Toward the Synthesis of Extra-Large-Pore MCM-41 Analogues. *Chem Mater.* 2001;13:1726-31.

Mercuri LP, Carvalho LV, Lima FA, Quayle C, Fantini MCA, Tanaka GS, Cabrere WH, Furtado MFD, Tambourgi DV, Matos J, Jaroniec M, Sant'Anna OA. Ordered mesoporous silica SBA-15: a new effective adjuvant to induce antibody response. *Small.* 2006;2:254-6.

Montagnon BJ, Fournier P, Vincent-Falquet JC. Un nouveau vaccin anti-rabique à usage humain: rapport préliminaire. In: Kuwert E, Merieux H, Koprowski H, Bogel K, editors. *Rabies in the tropics.* Berlin, Springer-Verlag. 1985;138-43.

Moura WC, Gallina NMF, Fuches RMM, Romijn PC, Leite JPG. Validation of a vírus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulin in a two-center study. *J Virol Methods.* 2008;154:7-13.

Mourão-Fuches RM. Avaliação da imunogenicidade da vacina contra raiva em células Vero, desenvolvida no Instituto Butantan, segundo dois esquemas de imunização em camundongos [dissertação (Mestrado em Ciências)]. São Paulo (Brasil): Programa de Pós-Graduação da Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2003.

Nicholson KG, Turner GS, Aoki FY. Immunization with a human diploid cell strain of rabies virus vaccine: two-years results. *J Infect Dis.* 1978;137:783-8.

Peck FB, Powell HM, Culberston CG. A new antirabies vaccine for human use. Clinical and laboratory results using rabies vaccine made from embryonated duck eggs. *J Lab Clin Methods.* 1955;45:679-83.

Plotkin SA. Immunologic correlates of protection induced by vaccination. *Pediatr Infect Dis J.* 2001;20:63-75.

Poisson N, Real E, Gaudin Y, Vaney MC, King S, Jacob Y, Tordo N, Blondel D. Molecular basis for the interaction between rabies virus phosphoprotein P and the dynein light chain LC8: dissociation of dynein-binding properties and transcriptional functionality of P. *J Gen Virol.* 2001;82:2691-6.

Quintilio W, Takata CS, Sant'Anna OA, da Costa MH, Raw I. Evaluation of a diphtheria and tetanus PLGA microencapsulated vaccine formulation without stabilizers. *Curr Drug Deliv.* 2009;6(3):297-304.

Raw I, Sant'Anna OA. Aventuras da microbiologia. São Paulo: Hacker; 2001. 171p.

Robinson J. Bioassays-a continuously developing field. *Drug Discov Today*. 2003;8(15):676-8.

Roumiantzeff M, Ajjan N, Montagnon B, Vincent-Falquet JC. Rabies vaccine produced in cell culture. *An Inst Pasteur Virol*. 1985;136:413-24.

Roumiantzeff M, Ajjan N, Vincent-Falquet JC. Experience with preexposure rabies vaccination. *Rev Infect Dis*. 1988;10 Suppl 4:S751-7.

Rupprecht CE, Hanlon CA, Hemachudha T. Rabies re-examined. *Lancet Infect Dis*. 2002;2:327-43.

Sabchareon A, Chantavanich P, Pasuralertsakul S, Pojjaroen-Anant C, Prarinyanupharb V, Attanath P, Singhasivanon V, Buppodom W, Lang J. Persistence of antibodies in children after intradermal or intramuscular administration of preexposure primary and booster immunizations with purified Vero cell rabies vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 1998;17(11):1001-7.

Sant'Anna OA. Areia poderosa. *Pesquisa Fapesp*. 2006;127:73-5.

Selimov MA, Aksenova TA. Tissue-culture antirabic vaccine for human use. In: *Proceedings of the Twelfth International Symposium organized by the permanent section of Immunological Standardization; 1965; Talloires*. Geneva: Karger; 1966;377-80.

Semple D. The preparation of a safe and efficient antirabic vaccine. *Sci Mem Med Sanit Dep Índia*. 1911; (44).

Shalaby WS. Development of oral vaccines to stimulate mucosal and systemic immunity: barriers and novel strategies. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995;74:127-34.

Shantavasinkul P, Tantawichien T, Wilde H, Sawangaree A, Kumchat A, Ruksaket N, Lohsoonthorn V, Khawplod P, Tantw Wichien T. Postexposure rabies prophylaxis completed in 1 week: preliminary study. *Clin Infect Dis*. 2010;50(1):56-60.

Smith JS. Rabies serology. In: Baer GM editor. The natural history of rabies, 2nd ed. Florida: CRC; 1991. p. 235-52.

Smith JS, Yager PA, Baer GM. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus–neutralizing antibody. In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H editors. Laboratory techniques in rabies, 4th ed. Geneva: WHO; 1996;p.181-92.

United States Pharmacopoeia. Monographs: Validation of compendial procedures. 1982;23:1225.

United States Pharmacopoeia-USP29. NF24. Monographs: Rabies Immune Globulin. 2007;p1887.

Strady A, Lang J, Lienard M, Blondeau C, Jaussaud R, Plotkin AS. Antibody persistence following preexposure regimens of cell-culture rabies vaccines: 10-year follow-up and proposal for a new booster policy. *J Infect Dis* 1998;177:1290-5.

Strady C, Hung Nguyen V, Jaussaud R, Lang J, Lienard M, STRADY A. Pre-exposure rabies vaccination: strategies and cost-minimization study. *Vaccine*. 2001;19:1416-24.

Sudarshan MK, Madhusudana SN, Mahendra BJ, Rao NS, Ashwath Narayana DH, et al. Assessing the burden of human rabies in India: results of a national multi-center epidemiological survey. *Int J Infect Dis*. 2007;11:29-35.

Takahashi I, Nochi T, Yuki Y, Kiyono H. New horizon of mucosal immunity and vaccines. *Curr Opin Immunol*. 2009;21:352-8.

Wang X, Bao M, Wan M, Wei H, Wang L, et al. A CpG oligodeoxynucleotide acts as a potent adjuvant for inactivated rabies virus vaccine. *Vaccine*. 2008;26:1893-901.

Wiktor TJ, Fernandes MV, Koprowski H. Cultivation of rabies virus in human diploid cell strain WI-38. *J Immunol*. 1964;93:353-60.

Wiktor TJ, Sokol F, Kuwert E, Koprowski H. Immunogenicity of concentrated and purified rabies vaccine of tissue culture origin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1969;131:799-805.

Willoughby RE Jr, Tieves KS, Hoffman GM, Ghanayem NS, Amlie-Lefond CM, Schwabe MJ, Chusid MJ, Rupprecht CE. Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N Engl J Med*. 2005;352(24):2508-14.

Winkler WG, Fashinell TR, Leffingwell L, Howard P, Conomy P. Airborne rabies transmission in a laboratory worker. *JAMA*. 1973;266:1219-21.

World Health Organization. Expert committee on rabies. Geneva WHO Tech Rep Ser 1992;824:10-27.

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

World Health Organization. Expert Committee on Biological Standardization. Geneva WHO Tech Rep Ser 1998; No. 785.

World Health Organization. WHO recommendations on rabies post-exposure treatment and the correct technique of intradermal immunization against rabies. WHO/EMC/ZOO/96.6, 1-24, 1997. Available from: http://www.who.int/rabies/en/WHO_recommendation_post_exp_treatment.pdf [2010 Feb 02].

World Health Organization. Tests for the determination of rabies antibodies. Available from: http://www.who.int/rabies/human/test_antibody/en/ [2010 Feb 02].

World Health Organization. Weekly epidemiological record. No. 49/50, 2007; 82: 425-36. Available from <http://www.who.int/wer> [2010 Feb 02].

World Health Organization. Rabies. Fact Sheet N°99. [monograph on the Internet] December 2008. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/> [2010 Feb 02].

Wunner WH, Larson JK, Dietzschold B, Smith CL. The molecular biology of rabies viruses. *Rev Infect Dis*. 1988;10:(suppl 4)S771-84.

Yang H, Coombs N, Ozin GA. Morphogenesis of shapes and surface patterns in mesoporous silica. *Nature*. 1997;386:692-5.

Zalan E, Wilson C, Pukitis D. A microtest for the quantification of rabies virus neutralizing antibodies. *J Biol Stand.* 1979;7:213-20.

Zanetti CR, Favoretto SR, Tino MS, Albas A, Valentini EJM, Pereira OA. Reduced schedule of human antirabies immunization with Fuenzalida and Palacios vaccine. *Rev Inst Med trop São Paulo.* 1989;31:23-7.

Zhao D, Feng J, Huo Q, Melosh N, Fredrickson GH, Chmelka BF, Stucky GD. Triblock copolymer synthesis of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstroms pore. *Science.* 1998;279:548-52.