

**GABRIELA MONTEIRO HABL**

**VERIFICAÇÃO DA APLICABILIDADE DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO NA  
DETERMINAÇÃO DO PERFIL FUNCIONAL DOS ANTICORPOS ANTITETÂNICOS  
EQUINOS PARA USO TERAPÊUTICO EM HUMANOS**

**RIO DE JANEIRO  
2020**

**GABRIELA MONTEIRO HABL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza  
Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do  
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Deivid Wanderson Couto dos Anjos

**RIO DE JANEIRO**  
**2020**

**GABRIELA MONTEIRO HABL**

**VERIFICAÇÃO DA APLICABILIDADE DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO NA  
DETERMINAÇÃO DO PERFIL FUNCIONAL DOS ANTICORPOS ANTITETÂNICOS  
EQUINOS PARA USO TERAPÊUTICO EM HUMANOS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Universidade do Grande Rio  
“Prof. José de Souza Herdy”, como requisito  
parcial para a obtenção do título de Bacharel  
em Biomedicina.

Orientador: Deivid Wanderson Couto dos Anjos

Aprovada em:

Barra da Tijuca, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2020.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Mestre. \_\_\_\_ (orientador)

---

Prof.

---

Especialista.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente aos meus pais, meu irmão, meu marido e amigos, pelo apoio e a força que me deram, onde nunca deixaram de acreditar em mim;

Ao meu orientador Deivid Wanderson Couto dos Anjos, pelo vasto ensinamento, incentivo e dedicação;

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde pela oportunidade de aprendizado;

A responsável pelo Setor de Vacinas Bacterianas do Laboratório de Vacinas Bacterianas e Soros Hiperimunes do INCQS, Dr. Daniela Tendler Leibel Bacellar, pela compreensão;

À Cristiane Santino da Silva ( bolsista/Fiotec) pela amizade e assistência nos experimentos;

Aos animais de laboratório que deram suas vidas em prol do projeto ser finalizado.

Obrigada!

# **VERIFICAÇÃO DA APLICABILIDADE DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO NA DETERMINAÇÃO DO PERFIL FUNCIONAL DOS ANTICORPOS ANTITETÂNICOS EQUINOS PARA USO TERAPÊUTICO EM HUMANOS**

Gabriela Monteiro Habl

## **RESUMO**

O tétano continua sendo um grave problema de saúde pública no Brasil, com média de 294 casos por ano. A doença por infecção pelo bacilo do tétano pode ser doença imunoprevenível por meio da vacina e do soro antitetânico (SAT). Antes de os imunobiológicos serem disponibilizados à população, são necessários testes de controle de qualidade nos lotes para verificar sua segurança e eficácia. No Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), os ensaios de potência são realizados como um dos testes farmacopéicos para avaliar a eficácia dos Soros Antitetânicos (SAT), exigindo um grande número de animais de laboratório no Teste de Neutralização de Toxinas (TNT). O objetivo deste estudo foi validar o teste de inibição da ligação de toxinas (ToBI) para substituir o TNT aplicado ao SAT. Os resultados encontrados indicam que o método proposto possui linearidade, especificidade e precisão satisfatórias, sendo um teste confiável e rápido, apresentando um bom desempenho em substituição à metodologia in vivo. O uso do método alternativo reduz drasticamente o uso de animais, o tempo de liberação de laudos e os custos de controle de qualidade do SAT.

Palavras-chave: Soros antitetânicos, ensaios de potência, controle da qualidade, validação; teste ToBI .

1

---

<sup>1</sup> Graduanda do curso de Biomedicina na Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO.

<sup>2</sup> Mestre em Vigilância Sanitária e Especialista em Análises Clínicas

## **ABSTRACT**

Tetanus remains a serious public health problem in Brazil, averaging 294 cases a year. The disease by tetanus bacillus infection may be immunopreventable disease through vaccine and anti-tetanus serum (SAT). Before immunobiologicals being made available to the population, quality control tests are required on batches to verify these safety and effectiveness. At the National Institute for Quality Control in Health (INCQS), the potency assays are performed as one of the pharmacopoeial tests to evaluate the effectiveness of Antitetanic Serums (SAT), demanding a large number of laboratory animals in the Toxin Neutralization Test (TNT). The aim of this study was to validate the Toxin Binding Inhibition test (ToBI) in order to substitute the TNT applied to SAT. The results found indicate the proposed method has satisfactory linearity, specificity and precision, being a reliable and quick test, presenting a good performance to replace the *in vivo* methodology. The use of the alternative method drastically reduces the use of animals, the time it takes to release reports and the costs to control the quality of the SAT.

**Keywords:** anti-tetanus sera, potency assays, quality control, validation; ToBI test .

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Diluição seriada na etapa de neutralização                                                                                                                   | 16 |
| <b>Figura 2.</b> Curva de dose-resposta da amostra de soro antitetânico de referência interna em diferentes dias pelo método de inibição da ligação da toxina <i>in vitro</i> | 23 |
| <b>Figura 3.</b> Coeficiente de correlação do SRI                                                                                                                             | 25 |
| <b>Figura 4.</b> Coeficiente de correlação do SRN                                                                                                                             | 26 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Critérios de validação de métodos analíticos                                                                                                       | 19 |
| <b>Tabela 2.</b> Titulação do Anticorpo Conjugado no ensaio 1, sendo confirmada a adequação da diluição de 1/27000 para o anticorpo de revelação                    | 21 |
| <b>Tabela 3.</b> Titulação do Anticorpo Conjugado no ensaio 2, sendo confirmada a adequação da diluição de 1/40500 para o anticorpo de revelação                    | 22 |
| <b>Tabela 4.</b> Potências da amostra, tituladas pelos ensaios <i>in vivo</i>                                                                                       | 22 |
| <b>Tabela 5.</b> Análise do sinal, avaliando a seletividade do ToBI para componente tetânico, na presença de uma toxina inespecífica e somente a toxina específica. | 24 |
| <b>Tabela 6.</b> Avaliação da precisão intra- ensaio do ToBI                                                                                                        | 27 |
| <b>Tabela 7.</b> Avaliação da precisão inter- ensaio do ToBI                                                                                                        | 27 |
| <b>Tabela 8.</b> Avaliação da exatidão do método ToBI                                                                                                               | 28 |

## SUMÁRIO

|                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                                      | <b>9</b>  |
| <b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                                                             | <b>12</b> |
| 2.1 – AMOSTRAS DE SOROS E REAGENTES                                                                       | 12        |
| 2.2 - TESTE DE INIBIÇÃO DE LIGAÇÃO DA TOXINA (TOBI)                                                       | 14        |
| 2.3 - DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DOS SOROS ANTITETÂNICOS                                                    | 16        |
| 2.4- TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO DA TOXINA EM CAMUNDONGOS (TNT)                                                | 17        |
| 2.5 - ESTABELECIMENTO DO SORO ANTITETÂNICO DE REFERÊNCIA PARA O TESTE IN VITRO                            | 18        |
| 2.6 - PLANO DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO IN VITRO                                                     | 18        |
| 2.7-ESTABELECIMENTO DOS CRITÉRIOS DE VALIDADE E LIMITES DE ACEITAÇÃO PARA OS ENSAIOS REALIZADOS PELO TOBI | 21        |
| <b>3. RESULTADOS</b>                                                                                      | <b>21</b> |
| <b>4. DISCUSSÃO</b>                                                                                       | <b>28</b> |
| <b>5. CONCLUSÃO</b>                                                                                       | <b>29</b> |
| <b>6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                                                       | <b>30</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

O tétano é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada pelo bacilo gram-positivo *Clostridium tetani*. A bactéria é anaeróbia, resistente ao calor, com capacidade de esporular. Em sua forma vegetativa, produz as exotoxinas tetanolisina e tet anospasmina (toxina tetânica), com ação sobre o sistema nervoso central, provocando a sintomatologia principal da doença. Etimologicamente, “tétano” tem sua origem na palavra grega “*teínein*”, que significa esticar; distender. Hipócrates apontava que “todo espasmo seguido a um ferimento, é mortal”. Entretanto, em 1884, Antonio Carle e Giorgio Rattone inocularam pus de ferimentos humanos no nervo ciático de coelhos descobrindo a etiologia da doença. *C. tetani* é encontrado normalmente no solo, na poeira e em fezes de animais e humanos, dependendo das condições físico-químicas, mas só encontrará porta de entrada para infecção através de material contaminado, ferimentos ou abrasões na pele, formando-se as condições de necrose ideais para a proliferação dessa bactéria na sua forma vegetativa. Com a liberação da tetanolisina, decorre no aumento local da necrose dos tecidos, o que favorece a esporulação e a propagação da infecção, juntamente há lesão celular. A neurotoxina tetanospasmina (TeNT) inibe a ação do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) e da glicina, um aminoácido que pode atuar como o GABA, ocasionando hiperexcitabilidade neuronal descontrolada, influenciando o sistema motor e o sistema nervoso autônomo (SNA). Dessa forma, podem ocorrer casos de taquicardia, espasmos vasculares acompanhados de hipertensão associada e sudorese profunda filiado a um aumento das catecolaminas plasmáticas. Além disso, a inibição da liberação desses neurotransmissores indiretamente condiciona a uma hiperatividade muscular descontrolada que se traduz em rigidez e espasmos musculares a classe dos neurónios motores ( YEN & THWAITES, 2019; SOLOMON & MILNER JR, 2017; VENTURA, 2015; GOMES, 2013; MADIGAN *et al.*, 2009).

Segundo apontamentos do Ministério da Saúde (BRASIL,2018), a doença apresenta-se em maior quantidade nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos. No Brasil, ocorrem em sua maioria entre o sexo masculino, principalmente em idosos que são mais suscetíveis a quedas e usuários de drogas. Contudo, a maior incidência decorre de objetos perfurocortantes. Os óbitos concentraram-se principalmente nas Regiões Nordeste e Sudeste. Como profilaxia, a

vacina é essencialmente preventiva, criando memória imunológica. Os soros antitetânicos (SAT), muito difundidos no Brasil para casos suspeitos e no tratamento de pacientes infectados, contém imunoglobulinas específicas contra os antígenos causadores da sintomatologia. Estes produtos biológicos são produzidos em equinos hiperimunizados contra *C. tetani* e são integrados por imunoglobulinas heterólogas, correspondendo em uma estrutura única, produzidas por linfócitos B, ligando-se e neutralizando patógenos. Os anticorpos são purificados e tratados por digestão com pepsina, perdendo a porção Fc, de modo que se apresentam em fragmentos únicos bivalentes  $F(ab')_2$ . Assim, perde-se a ligação inespecífica entre porções Fc de anticorpo e receptores nas células, tornando o anticorpo mais estável (OKUMOTO, 2018; HEY, 2015; ALBERTS *et al.*, 2014).

Na avaliação da interação entre antígeno-anticorpo, são considerados os parâmetros de especificidade. O grau de afinidade entre um único tipo antigênico e um sítio de um anticorpo específico, possibilitando uma interação estável, é caracterizada pela constante de dissociação (Kd). A avidéz é a força total de ligação dentre diversos epítomos de um antígeno com um anticorpo multivalente. O ponto de equilíbrio dos complexos imunes é representada pela constante de associação (Ka) (ROITT *et al.*, 2018). Com base nesses indicadores, testes de potência para soros antitetânicos são preconizados pela Farmacopéia Brasileira para determinar títulos de anticorpos e avaliar a capacidade do produto de conferir proteção contra as toxinas específicas frente a uma possível infecção. Tradicionalmente, esses testes são realizados através do método de soroneutralização em camundongos (TNT), considerado o padrão-ouro, no qual ocorre a análise da capacidade de neutralização de diferentes diluições dos anticorpos frente a uma dose de toxina tetânica paralisante de membro posterior de camundongos. Após inoculação da mistura antígeno-anticorpo, observa-se por 96 horas a progressão do grau de paralisia nos animais nas diferentes diluições, variando desde o T0 (Nenhum efeito) a T5 (a paralisia total de membro posterior), ou D (morte; do inglês *death*). Ao final da leitura, estima-se a dose efetiva capaz de proteger um mínimo de 50% dos animais (DE50) contra a sintomatologia crítica do tétano, definida como T2 (paresia da pata a qual foi inoculada a preparação, mantida a função locomotora) ou T3 (paralisia da pata a qual foi inoculada a preparação, sem função locomotora). A potência é obtida da razão entre a DE50 de uma preparação de referência de SAT e a DE50 do soro-teste,

multiplicada pela potência do SAT de referência, em UI/mL. Frente às recomendações da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2019), para o doseamento de um único lote de SAT são usados, no mínimo, 70 animais. Entretanto, métodos alternativos *in vitro* em substituição ao uso de animais de potências já são mencionados no compêndio oficial, como ocorre com o Teste de Inibição de Ligação da Toxina (ToBI; do inglês, *Toxin Binding Inhibition Test*). Trata-se de um ensaio imunoenzimático semi-funcional, realizado em duas etapas: a inicial, reação de soroneutralização; e, em seguida, a reação de imunoabsorção enzimática (ELISA) (BRASIL, 2019; LAWAL, 2014; WHO, 2013; SONOBE *et al.*, 2007).

Conforme a RDC 166/17 da ANVISA, a validação de métodos analíticos deve atender aos critérios de: seletividade (especificidade do soro na presença de componentes semelhantes que possam interferir no desempenho); linearidade (grau de correlação dose-resposta em faixa de trabalho estabelecida); precisão (avaliação de resultados em dias e com analistas independentes do próprio laboratório, com análise de repetibilidade intra- e interensaios, além da reprodutibilidade); exatidão (resultados obtidos em relação ao valor verdadeiro); limite de detecção (menor quantidade de soro presente em uma amostra a ser detectada mas não necessariamente quantificada); limite de quantificação (menor quantidade do analito na amostra a ser detectada quantitativamente pela precisão e exatidão); intervalo (faixa entre os limites de quantificação superior e inferior) (BRASIL, 2017; HEY, 2015).

Por sua vez, o controle de qualidade, de acordo com a RDC n. 73/2008 da ANVISA, é o conjunto de atividades destinadas a verificar e assegurar que os ensaios necessários e relevantes sejam executados e que o produto não seja disponibilizado para uso e venda até que cumpra com a qualidade preestabelecida. Nesse sentido, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) é o laboratório oficial do Ministério da Saúde, responsável pela liberação dos soros antitetânicos produzidos no Brasil para o consumo, adotando as exigências regulatórias pertinentes, sob fiscalização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2008). Por isso, os testes de potência realizados no INCQS devem ser rigorosamente validados a fim de serem adotados na rotina de liberação de lotes de SAT. Atualmente, o teste ToBI apresenta protocolo padronizado no INCQS, contudo, sem submeter-se aos critérios oficiais de validação. O ensaio *in vitro* faz analogia

direta à reação de neutralização *in vivo*, permitindo a redução do uso de animais, diminuição de gastos e agilidade aos trâmites de controle da qualidade. Assim, a elaboração de um plano de validação se faz necessária no intuito de verificar a aplicabilidade do método para uso na rotina das determinações de potência dos soros antitetânicos nacionais pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Esse projeto tem como objetivo verificar a aplicabilidade do Teste de Inibição de Ligação da Toxina (ToBI) na determinação do perfil funcional dos anticorpos antitetânicos equinos para uso terapêutico em humanos. Com foco em estabelecer um soro antitetânico de referência interna para o ensaio imunoenzimático, determinar critérios de validade e limites de aceitação para os ensaios realizados pelo ToBI e estabelecer um plano de trabalho para avaliar o método através da seletividade, linearidade, repetitividade (precisão intra-ensaio), precisão intermediária (precisão inter-ensaios) e exatidão (especificidade).

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

Este trabalho caracteriza-se como exploratório, a partir de dados laboratoriais quantitativos, com foco em perspectivas qualitativas na tomada de decisões. No sentido de verificar a aplicabilidade do teste de Inibição da Ligação da Toxina (ToBI) como método alternativo ao uso de animais nos ensaios de potência de soros antitetânicos, foram realizadas etapas de: obtenção e seleção de soros hiperimunes comerciais para análise, obtenção e titulação dos reagentes (anticorpos conjugados, soros de captura, soros de referência e toxinas de referência), além do desenvolvimento dos métodos *in vivo* e *in vitro*.

### **2.1 – AMOSTRAS DE SOROS E REAGENTES**

Foram utilizados para o componente tetânico, o soro de referência internacional (SRI) e nacional (SRN), assim como 22 amostras (lotes do ano de 2018 e 2019) de soro eqüino antitetânico (SAT) de laboratório nacional de produção (soros-teste). A toxina tetânica foi fornecida pelo Instituto Butantan e aliqüotada no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) com a concentração de 18,0 Lf/mL; uma amostra de soro de captura foi eleita dentre os lotes de SAT

recebidos pelo INCQS; a preparação de antitoxina tetânica conjugada à peroxidase (IgG-HRP) foi obtida do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Biomanguinhos/FIOCRUZ, e titulada no INCQS; a solução de substrato TMB (3,3',5,5' - Tetrametilbenzidina) foi adquirida da SIGMA®.

### **Soros de referência nacional (SRN) e internacional (SRI)**

O soro equino de referência internacional (SRI), constituído de anticorpos policlonais antitetânicos inteiros, foi fornecido pelo *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC), de Hertfordshire, United Kingdom, com potência em 230 UI/mL, previamente determinada em estudos interlaboratoriais de diversos países. Esse SRI foi acondicionado no INCQS em alíquotas de 10 UI/mL, utilizado para calibrar a potência do soro de referência nacional (SRN). O SRN antitetânico é uma combinação de soros antitetânicos liofilizados de diferentes produtores nacionais. Para a utilização, o conteúdo de cada frasco é ressuspendido com solução salina 0,85 % enriquecida com 1% de peptona e 60 % de glicerol, de modo a obter 10 UI/mL. O SRN tem a sua potência periodicamente determinada *in vivo* após a aferição frente ao soro internacional. Assim, a potência do soro de referência nacional antitetânico é de 10 UI/mL. A preparação é utilizada na rotina dos ensaios *in vivo* para determinar a potência relativa do componente tetânico presente em soros e vacinas no INCQS.

### **Soro eqüino hiperimune (Soro hiperimune)**

Foram selecionados 22 lotes de soro antitetânico (SAT), dos anos de 2018 e 2019, procedentes de produtores nacionais. Os anticorpos IgG policlonal contra a toxina tetânica são fragmentados por tratamento com pepsina e purificados por cromatografia, antes de serem envasados. Um conservante adequado é adicionado e o produto final é apresentado sob forma líquida. O produto líquido é límpido, incolor ou ligeiramente amarelado, não apresentando grumos ou partículas. A preparação é distribuída assepticamente em ampolas ou frascos-ampola.

Tais amostras foram analisadas pelo INCQS seguindo os critérios estabelecidos por normas oficiais. A potência foi previamente determinada *in vivo* pelo produtor e confirmada pelo INCQS, adotando critério mínimo de 1000 UI/mL.

## **Toxina tetânica de referência**

A toxina tetânica de referência é preparada a partir de filtrados estéreis de sobrenadantes de cultivos líquidos de *C. tetani* incubados durante cinco a sete dias. O filtrado deve ser concentrado, purificado por métodos físicos ou químicos e liofilizado. Após a reconstituição, deve-se adicionar solução salina glicerinada e armazenar a amostra a -20 °C. As toxinas utilizadas no presente estudo são de obtenção nacional. Foi estimada a menor dose de toxina capaz de causar paralisia de membro posterior de 100% dos camundongos (Lp/10; limite paralisante) frente a uma dose de 0,1 UI/animal de antitoxina de referência internacional, em um período de 96 horas após a inoculação. A determinação da Lp/10 é utilizada na realização do ensaio *in vivo* de potência. Para o teste *in vitro*, padronizou-se a dose de 0,1 Lf/mL de toxina, conforme sugere o protocolo da Organização Mundial da Saúde para titulação de anticorpos na avaliação de atividade imunogênica de vacinas antitetânicas.

## **2.2 - TESTE DE INIBIÇÃO DE LIGAÇÃO DA TOXINA (TOBI)**

### **Princípio metodológico**

O ToBI é um ensaio imunoenzimático semi-funcional que consiste na inibição da ligação da toxina na microplaca de 96 poços de fundo chato sensibilizada com antitoxina específica. O teste é dividido em duas etapas:

- 1) Neutralização: Incubação da mistura de diferentes concentrações de soro teste com a toxina tetânica, em microplacas de 96 poços de fundo chato ou redondo.
- 2) Reação Imunoenzimática: Captura da toxina não-neutralizada pelo soro da fase de neutralização, em uma microplaca sensibilizada com antitoxina específica. Em seguida, o anticorpo antitoxina conjugado à peroxidase é adicionado, a reação colorimétrica e imunoenzimática é obtida com uso de substrato TMB. A reação é interrompida e revelada por espectrofotometria.

Portanto, a detecção da D.O. no ensaio é inversamente proporcional à potência

do soro hiperimune, ou seja, quanto maior a capacidade de neutralização do soro, maior será a potência do produto em teste e menor será a detecção final de toxinas livres na placa de captura.

### **Titulação dos anticorpos conjugados à peroxidase**

A titulação do anticorpo equino antitetânico conjugado à peroxidase depende apenas da etapa de reação imunoenzimática do teste ToBI, no intuito de obter a menor concentração de anticorpo IgG-HRP com densidades óticas próximas de 1,0 UA para o controle positivo e 0,1 UA para o controle negativo, considerando o critério da razão Positivo/Negativo maior que 15. A solução com anticorpos marcados foi distribuída em alíquotas de 100µL/frasco ao total abrigo da luz, estocadas de 2-8°C.

A titulação do anticorpo marcador é imprescindível para a realização do ensaio completo de determinação da potência pelo Teste ToBI. Para o procedimento, houve a sensibilização de uma microplaca ELISA de 96 poços com 1.0 UI/ml de soro equino antitetânico de captura em tampão carbonato sendo coberta com filme adesivo, incubada de 16-18 horas à 37°C na estufa, em câmara úmida. No dia subsequente, foi retirada esta placa, ocorrendo a lavagem em cinco ciclos com a solução aquosa a 0,05% de Tween 80 no lavador de placas automático. Após, realizou-se o bloqueio da placa contra ligações inespecíficas, utilizando 125 µl/poço da solução de 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) em tampão salino-fosfato (PBS), incubando a microplaca por 60 minutos à 37°C. Repetiu-se o protocolo de lavagem da placa. Adicionou-se 100µL/poço de PBS nos 96 orifícios, completando os controles positivos com 40µL/poço da toxina tetânica diluída em PBS a 0,1 Lf/mL, sucedendo incubação por 2 horas a 37°C. Mais uma vez o protocolo de lavagem das placas foi executado. A toxina presente na placa foi capturada pelos anticorpos dispostos nos poços e a detecção do antígeno se deu adicionando 100µL/poço de diferentes títulos da solução de anticorpos IgG-HRP, diluídos em solução aquosa com Tween 80 a 0.05% e BSA a 0.5%, sucedendo incubação por 90 minutos a 37°C. Repetiu-se o protocolo inicial de lavagem das placas. Para a reação enzimática colorimétrica, adicionou-se 100µL por poço do substrato 3,3',5,5' - tetrametilbenzidina (TMB) em cada cavidade, mantida à temperatura ambiente e sob abrigo da luz por 10 minutos. Em seguida, a reação foi interrompida adicionando 100 µl/poço da solução de ácido sulfúrico a 2M. A leitura das absorbâncias ocorreu em espectrofotômetro para testes ELISA com comprimento

de onda de 450 nm.

## 2.3 - DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DOS SOROS ANTITETÂNICOS

### Etapa de Neutralização

Uma microplaca de 96 poços de poliestireno de fundo chato ou redondo foi identificada e 150 µl de solução de bloqueio contendo 0,5% de albumina sérica bovina em PBS foi adicionada em cada poço com uma pipeta multicanal. A microplaca foi incubada por 60 minutos a 37°C em câmara úmida. Em seguida, foram realizados cinco ciclos de lavagem com solução composta por água com 0,05% de Tween 80.

A diluição seriada dos soros( Figura 1 ), em PBS, partiu de uma diluição 1/1600 para soros antitetânicos de referência e soros-teste e diluição 1/10 para soro-controle internacional aliquotado a 10 UI/mL, de modo que todos os poços com soros apresentaram volume final de 100µL. Adicionou-se 150µL e 100 µL de PBS nos poços do controle negativo e controle positivo, respectivamente, completando os controles positivos e diluições de soros com 40µL/poço da toxina tetânica, previamente diluída em PBS a 0,1 Lf/mL, sucedendo incubação de 16-18 horas a 37°C, em câmara úmida.

Figura 1: Diluição seriada na etapa de neutralização.

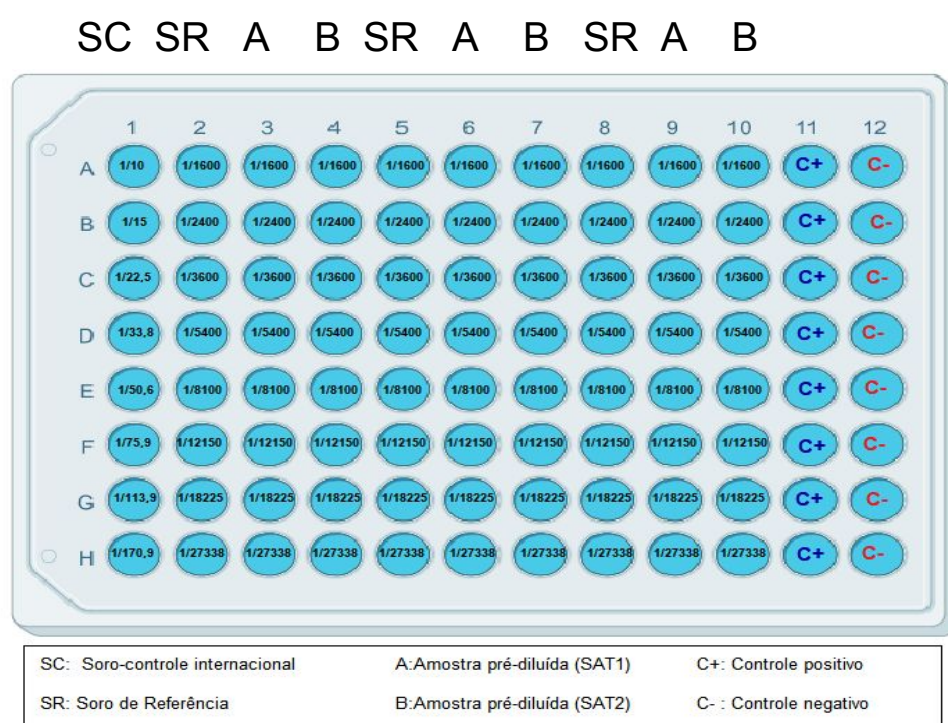


Figura 1: **Diluição seriada na etapa de neutralização.** Microplaca de fundo chato com 96 poços diluída em série realizando o esquema de distribuição dos soros na placa em conjunto com PBS.

### **Reação Imunoenzimática**

Em uma microplaca de ELISA de 96 poços de fundo chato, adicionou-se 100 µl/poço da solução de anticorpo de captura a 1.0 UI/mL em tampão carbonato. A microplaca foi vedada e incubada na câmara úmida em 37°C por 16-18 horas. Em seguida, lavada cinco vezes com solução de lavagem já descrita. Após, a placa foi bloqueada com 125 µl/poço com solução de 0,5% de BSA em PBS, seguida de incubação por 60 minutos a 37°C em atmosfera úmida.

Subsequentemente, lavou-se a microplaca com solução de lavagem e foi transferido o volume homogeneizado de 100 µl/poço do conteúdo da microplaca da etapa de neutralização para os respectivos poços da microplaca de ensaio imunoenzimático, seguindo incubação por 2 horas a 37°C em atmosfera úmida. A seguir, fez-se a lavagem da microplaca e adicionou-se 100 µl/poço da solução de antitoxina conjugada à peroxidase, com título pré-estabelecido em procedimentos já descritos, utilizando solução de 0,5% de BSA e 0,05% de Tween 80 em PBS, sendo coberta e incubada por 90 minutos ao abrigo da luz em 37°C em atmosfera úmida. Após, foi feito o procedimento de lavagem da placa e adicionado 100 µl/poço da solução de substrato, sob incubação da placa à temperatura ambiente e sob abrigo da luz por 10 minutos. A reação foi interrompida, adicionando-se 100 µl/poço de solução de ácido sulfúrico 2 M. Ocorreu a leitura da reação em leitor de ELISA a um comprimento de onda de 450 nm.

## **2.4- TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO DA TOXINA EM CAMUNDONGOS (TNT)**

### **Determinação da dose teste de toxina (Lp/10)**

Realizou-se a diluição da antitoxina tetânica de referência com solução salina a 0,85% (p/v), e a toxina diluída em solução salina peptonada a 1% (p/v). Em tubos de vidro foram adicionados volumes variados de toxina e um volume constante da antitoxina de referência diluída, igualados com solução salina contendo 1% de peptona, onde cada tubo foi vedado, homogeneizado e incubado a 37 °C por 60 minutos. Em seguida, foram selecionados dez camundongos albino suíço de 17g a

22g, para cada diluição, inoculado-os por via subcutânea um volume de 0,1 UI/ml de soro. Observa-se os animais em até 96 horas após a inoculação e registra-se a quantidade dos que apresentam paralisia de membro posterior, conforme preconiza a monografia para Soros Antitetânicos da Farmacopeia Brasileira. A diluição com menor concentração de toxina, que causou a paralisia de todos os animais de um grupo, em 96 horas, foi selecionada para as etapas subsequentes do método *in vivo*.

### **Definição da potência do soro antitetânico**

Adotou-se um espectro com quatro diluições seriadas do soro antitetânico de referência, e três a seis diluições dos soro-teste, com fator de diluição de 1,2. Adicionou-se o volume de 15 Lp/10 da toxina tetânica de referência e completou-se cada preparação com salina tamponada contendo peptona a 1% (p/v) em quantidade suficiente para 3 mL por tubo de ensaio. As misturas de soro-toxina foram homogeneizadas e incubadas a 37 °C por 60 minutos. Para cada diluição de soro, procedeu-se a inoculação subcutânea de 0,2 mL da mistura em dez camundongos albino-suíço, de 17-22 g, em membro posterior. Observou-se os camundongos por 96 horas, registrando a sintomatologia de T0 a T5. A potência relativa é determinada por análise estatística de probitos para estimativa da dose efetiva de cada soro capaz de proteger 50% dos animais (DE50); ensaio quantal.

## **2.5 - ESTABELECIMENTO DO SORO ANTITETÂNICO DE REFERÊNCIA PARA O TESTE IN VITRO**

Um dos lotes de soro antitetânico com potência próxima de 1000 UI/mL, recebido pelo INCQS entre 2018 e 2019, com validade vigente para o uso, foi escolhido e aferido pelo TNT em animais, no INCQS, em um mínimo de três ensaios válidos independentes. A combinação ponderada ( $p \geq 0,1$ ) ou semi-ponderada ( $p < 0,1$ ) dos resultados de diferentes ensaios foi pelo software estatístico CombiStats.

## **2.6 - PLANO DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO IN VITRO**

No intuito de validar o teste ToBI para uso na rotina dos ensaios de potência, cabe a elaboração de um plano de trabalho a ser acompanhado ao longo das aferições. Nesse sentido, adotou-se as recomendações publicadas pela RDC

n.166/2017 da ANVISA, na qual constam os critérios de validação de métodos analíticos. As devidas adaptações para a rotina de análises do INCQS serão devidamente consideradas, utilizando dos itens mínimos para a implementação do teste ToBI, visto que a técnica já tem um uso difundido para análise de atividade imunogênica em vacinas antitetânicas na Europa, com protocolo descrito em Farmacopeia Europeia, dispensando maior rigor técnico obtido com muitas aferições. Os critérios que irão compor o plano de validação e suas definições estão contidas na tabela 1. (COUNCIL OF EUROPE,2013).

**Tabela 1: Critérios de validação de métodos analíticos**

| Definição                                 |                                                                                                                                                     |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Seletividade                              | Capacidade de identificação ou quantificação de amostras com precisão perante a presença de componentes adversos, impurezas e componentes da matriz |
| Linearidade                               | Capacidade de corresponder proporcionalidade entre as respostas analíticas à concentração de um analito em uma amostra                              |
| Repetitividade<br>(precisão intra-ensaio) | Equivalência entre os resultados dentro de um período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação                                          |

|                                                        |                                                                                                                                                                |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                        |                                                                                                                                                                |
| Precisão intermediária<br><br>(precisão inter-ensaios) | Expressa pela a aproximação entre os resultados de uma mesma amostra, num mesmo laboratório, em pelo menos dois dias distintos e por dois analistas diferentes |
| Limite de Quantificação                                | Menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas            |
| Limite de Detecção                                     | Menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas       |
| Exatidão                                               | Concordância dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor aceito como verdadeiro                                                           |

Referência:BRASIL,2017

## 2.7-ESTABELECIMENTO DOS CRITÉRIOS DE VALIDADE E LIMITES DE ACEITAÇÃO PARA OS ENSAIOS REALIZADOS PELO TOBI

Ao longo da realização dos ensaios, diferentes parâmetros de garantia da qualidade dos ensaios serão identificados e acompanhados. Os respectivos dados serão registrados em planilhas para análise estatística, confecção de gráficos de controle e avaliação de tendências, a partir de média e desvio-padrão. Um mínimo de 15 aferições independentes, de ensaios *in vitro* válidos, poderão definir critérios de validade dos ensaios frente aos parâmetros de impacto na eficácia final dos resultados.

### 3. RESULTADOS

#### DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS DO ANTICORPO EQUINO ANTITETÂNICO CONJUGADO À PEROXIDASE

Foram determinados os títulos de anticorpos antitetânicos conjugados à peroxidase no ano de 2019 (ensaio 1) e no ano de 2020 (ensaio 2), pelo método ELISA, com foco em densidades óticas (D.O.) do controle positivo em torno de 1,000 e do controle negativo inferiores a 0,100, considerando a razão Positivo/Negativo  $\geq 15$ . No ensaio 1 (Tabela 2) foi realizado uma titulação considerando diluições de 1/8000 a 1/256000, com fator de diluição 1,5, com resultados esperados na diluição 1/27000. No ensaio 2 (Tabela 3) realizou-se uma titulação entre as diluições 1/12000 a 1/121500, com fator de diluição 1,5, apresentando desempenho satisfatório de valores D.O para os controles positivo e negativo, na maior diluição de conjugado que melhor se ajustou aos critérios da OMS (WHO, 1997) foi a diluição 1/40500.

**Tabela 2: Titulação do Anticorpo Conjugado no ensaio 1, sendo confirmada a adequação da diluição de 1/27000 para o anticorpo de revelação.**

| Controle Positivo (D.O) | Controle Negativo (D.O) | Desvio Padrão (DP +) | Desvio Padrão (DP-) | Coef. de variação (CV%+) | Coef. de variação (CV%-) | P/N   |
|-------------------------|-------------------------|----------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|-------|
| 1,021                   | 0,047                   | 0,071                | 0,001               | 7%                       | 3%                       | 21,40 |

Tabela 2: Titulação do Anticorpo Conjugado no ensaio 1, sendo confirmada a adequação da diluição de 1/27000 para o anticorpo de revelação. Representação dos resultados da microplaca em determinar a titulação dos anticorpos antitetânicos conjugados à peroxidase em uma janela de diluições, com fator de diluição 1,5. Efetuando uma média aritmética dos critérios indispensáveis sendo a D.O e a razão P/N.

Tabela 3: Titulação do Anticorpo Conjugado no ensaio 2, sendo confirmada a adequação da diluição de 1/40500 para o anticorpo de revelação.

| Controle Positivo (D.O) | Controle Negativo (D.O) | Desvio Padrão (DP +) | Desvio Padrão (DP-) | Coef. de variação (CV%+) | Coef. de variação (CV%-) | P/N   |
|-------------------------|-------------------------|----------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|-------|
| 1,172                   | 0,048                   | 0,034                | 0,001               | 3%                       | 2%                       | 24,40 |

Tabela 3: Titulação do Anticorpo Conjugado no ensaio 2, sendo confirmada a adequação da diluição de 1/40500 para o anticorpo de revelação. Representação dos resultados da microplaca em determinar a titulação dos anticorpos antitetânicos conjugados à peroxidase em uma janela de diluições, com fator de diluição 1,5. Efetuando uma média aritmética dos critérios indispensáveis sendo a D.O e a razão P/N.

## ESTABELECIMENTO DE UM SORO ANTITETÂNICO DE REFERÊNCIA INTERNA PARA O ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

Para o estabelecimento da referência interna do soro antitetânico foram utilizados dez animais por diluição do SAT frente a uma dose Lp/10 da toxina (limite paralisante por 10). Após avaliar a estabilidade da dose efetiva média (DE50) do soro de referência em quatro aferições do SAT, em dias distintos, obteve-se potência média de 995 UI/mL (Tabela 4), através do software CombiStats como ferramenta de cálculo da potência, respeitando os critérios do Método dos Mínimos Quadrados (MMQ), dos quais não devem ocorrer desvios significativos de paralelismo e linearidade (Figura 2), com regressão significativa, para  $\alpha = 0,05$  e intervalo de confiança de 95%.

Tabela 4 : Potências da amostra, tituladas pelos ensaios *in vivo*.

| Estabelecimento do soro antitetânico de referência |            |
|----------------------------------------------------|------------|
| Dia 1                                              | 1031 UI/ml |
| Dia 2                                              | 1043 UI/ml |
| Dia 3                                              | 964 UI/ml  |
| Dia 4                                              | 925 UI/ml  |
| Média final                                        | 995 UI/ml  |

Tabela 4 : Potências da amostra, tituladas pelos ensaios *in vivo*. Resultado do soro antitetânico de referência interna estabelecido por média de quatro dias distintos, efetuado pelo Teste de Neutralização da Toxina em camundongos.

**Figura 2 : Curva de dose-resposta da amostra de soro antitetânico de referência interna em diferentes dias pelo método de inibição da ligação da toxina *in vitro*.**

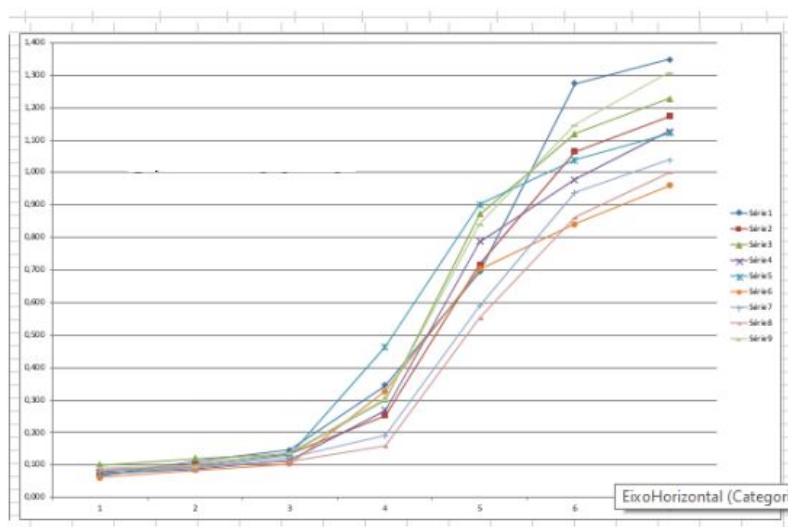


**Figura 2 : Curva de dose-resposta da amostra de soro antitetânico de referência interna em diferentes dias pelo método de inibição da ligação da toxina *in vitro*.** Representação gráfica de dias distintos, realizado pelo programa excel, da variação de absorbâncias, que são o eixo das ordenadas à medida que aumenta as diluições do soro que corresponde ao eixo das abscissas .

## **DETERMINAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE VALIDADE E LIMITES DE ACEITAÇÃO PARA OS ENSAIOS REALIZADOS PELO TOBI**

O principal parâmetro de validade do teste ToBI foi adotado dos manuais da OMS, que estabelece limites superiores e inferiores de absorbância para os controles positivo e negativo do ensaio. Por meio de gráficos de controle e tendência, adotou-se como válidos os ensaios com controle positivo entre 0,600 e 1,500 unidades de absorbância. Para controle negativo, os valores de absorbância não deveriam estar acima de 0,100.

Outros limites de aceitação foram avaliados uma vez que o soro de referência interno foi estabelecido. O soro de referência internacional (NIBSC 60/013) foi utilizado como amostra-controle, uma vez que seu desempenho é conhecido no método *in vitro*. Nesse sentido, as estabilidades da inclinação da curva (*slope*) dose-resposta, bem como da dose efetiva média (DE50) do SAT internacional foram controladas. Os mesmos critérios passaram a ser observados para o soro de referência interno.

A correlação da dose resposta para cada um dos soros de referência não

deveria estar abaixo de 0,95, de modo a preservar a linearidade e as doses em torno da dose efetiva média.

Uma vez que os critérios de aceitação foram atendidos, o cálculo de potência dos soros considerou fixar a inclinação da curva dose-resposta do soro de referência interna como recurso adicional para a obtenção de paralelismo com a curva da amostra-teste.

## **AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DO TOBI**

### **Seletividade**

Através de teste T de Student para médias pareadas, foram comparados os valores de absorbância de poços contendo diluições dos soros antitetânicos de referência interna e internacional sem contaminação e contaminados com soro antidiftérico na proporção de 1:2 por poço, para comprovação da ligação somente da toxina tetânica. A presença do soro inespecífico não alterou significamente a capacidade de neutralização ou de detecção da toxina específica frente às doses de soro antitetânico em 7 poços observados, não modificando o desenho e inclinação da curva dose-resposta dos materiais de referência e das amostras de soro, sem efeitos diferenciais na potência (  $p > 0,050$ ) ( Tabela 5 ).

**Tabela 5: Análise do sinal, avaliando a seletividade do ToBI para componente tetânico, na presença de uma toxina inespecífica e somente a toxina específica.**

|                                              |        |
|----------------------------------------------|--------|
| Soro de referência internacional puro        | 0,5911 |
| Soro de referência internacional contaminado | 0,5409 |
| Soro de referência nacional puro             | 0,2997 |
| Soro de referência nacional contaminado      | 0,298  |
| Soro hiperimune antitetânico puro            | 0,2416 |
| Soro hiperimune antitetânico contaminado     | 0,2586 |

Tabela 5: **Análise do sinal, avaliando a seletividade do ToBI para componente tetânico, na presença de uma toxina inespecífica e somente a toxina específica.** A representação do desempenho do método em razão

de poços com outros componentes, indicando que a presença não interfere na neutralização ou detecção da toxina específica presente nas amostras de soro.

## Linearidade

A linearidade foi aferida com o mínimo de 5 diluições para o soro de referência internacional (SRI) e do soro de referência nacional estabelecido (SRN). O coeficiente de correlação foi obtido através do gráfico de logaritmo da diluição frente a absorbância, resultando numa correlação de  $r=0,9953$  para o SRI ( Figura 3) de  $r=0,9917$  para o SRN (Figura 4), o que demonstra uma satisfatória linearidade do método.

**Figura 3: Coeficiente de correlação do SRI**



**Figura 3: Coeficiente de correlação do SRI.** Determinado através do gráfico do log da diluição pela absorbância, realizado por 5 diluições, junto ao paralelismo sendo quesitos necessários para validar os resultados do soro de referência internacional( NIBSC), obtendo valores maiores de 0,990 para o coeficiente de correlação.

**Figura 4: Coeficiente de correlação do SRN**

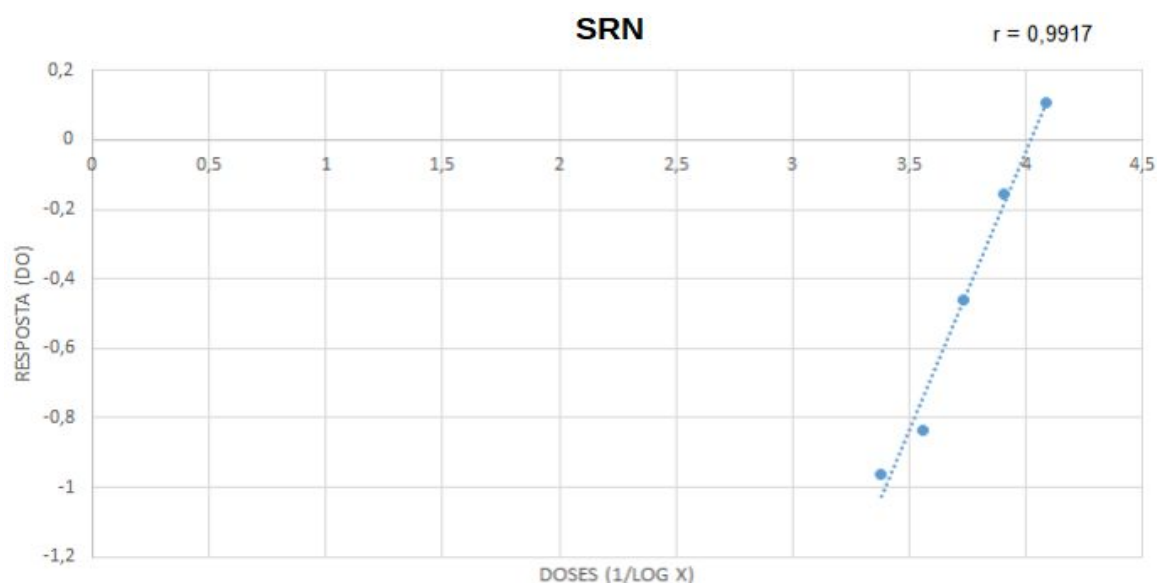


**Figura 4: Coeficiente de correlação do SRN.** Determinado através do gráfico do log da diluição pela absorbância, realizado por 5 diluições, junto ao paralelismo sendo necessário para validar os resultados do soro de referência nacional, determinando - se valores maiores de 0,990 para o coeficiente de correlação.

#### Repetitividade (Precisão Intra-ensaio)

Foram calculados os coeficientes de variação (CV%) das potências para avaliar a repetitividade do teste ToBI, utilizando sete diluições seriadas de 3 amostras com baixa, média e alta concentração, respectivamente, aferidas em triplicatas em um mesmo dia (Tabela 6). Nesse estudo, os resultados foram obtidos independentemente por dois analistas. É possível observar que os valores (CV<10%) abaixo encontram-se abaixo satisfatórios para os parâmetros da AOAC (2000), conforme adotado pelo INCQS, resultando em uma boa repetitividade para resultados obtidos por ambos os analistas independentes.

**Tabela 6: Avaliação da precisão intra-ensaio do ToBI.**

|                                | Analista 1 |       |       | Analista 2 |       |       |
|--------------------------------|------------|-------|-------|------------|-------|-------|
| Concentração                   | ALTA       | MÉDIA | BAIXA | ALTA       | MÉDIA | BAIXA |
| Réplica 1 (UI/mL)              | 1354       | 955   | 837   | 1327       | 1007  | 743   |
| Réplica 2 (UI/mL)              | 1346       | 973   | 772   | 1388       | 1136  | 830   |
| Réplica 3 (UI/mL)              | 1298       | 930   | 800   | 1307       | 941   | 824   |
| Média aritmética INTRA (UI/mL) | 1333       | 953   | 803   | 1341       | 1028  | 799   |
| Desvio padrão (UI/mL)          | 30         | 22    | 33    | 42         | 99    | 49    |
| Coefficiente de Variação       | 2,3%       | 2,3%  | 4,1%  | 3,1%       | 9,6%  | 6,1%  |

Tabela 6 :**Avaliação da precisão intra-ensaio do ToBI.** Calculado a partir de 7 diluições em triplicata dentre elas três soros hiperimunes de diferentes lotes em um mesmo dia, realizada a partir do cálculo de coeficiente de variação (CV%) no qual é obtido a partir da razão entre a raiz da média das variâncias pela média das diluições, os resultado devem ficar abaixo de 10% (CV<10%) em cada concentração.

#### Precisão intermediária (Precisão Inter-ensaio)

Para avaliar a precisão intermediária, foram calculados os CV% das potências, com o uso de sete diluições dos soros em triplicata em dois dias distintos, comparando o desempenho do teste por dois analistas, em três amostras de baixa, média e alta concentração, respectivamente. Observa-se que os valores de potência entre diferentes analistas, em dias distintos (CV<20%), indicaram boa precisão intermediária do método (Tabela 7) (AOAC,2000).

**Tabela 7: Avaliação da precisão inter-ensaio do ToBI.**

| Concentração             | ALTA       | MÉDIA     | BAIXA     |
|--------------------------|------------|-----------|-----------|
| Replicatas (n)           | 3+3        | 3+3       | 3+3       |
| Média aritmética (INTER) | 1337 UI/mL | 990 UI/mL | 801 UI/mL |
| Desvio padrão            | 33 UI/mL   | 76 UI/mL  | 37 UI/mL  |
| Coefficiente de Variação | 2,5%       | 7,7%      | 4,6%      |

Tabela 7:**Avaliação da precisão inter-ensaio do ToBI.** Calculado a partir de 7 diluições em triplicata dentre elas três soros hiperimunes de diferentes lotes em dias distintos, realizada a partir do cálculo de coeficiente de variação (CV%) no qual é obtido a partir da razão entre a raiz da média das variâncias (entre os 2 dias) pela média obtida nos diferentes dias, os resultado devem ser abaixo de 20% (CV<20%) em cada concentração.

## Exatidão

A exatidão é obtida pela aproximação dos valores entre resultados avaliados de forma individual do método em estudo a um valor aceito como verdadeiro, associado aos erros sistemáticos. Essa etapa da validação avalia, no mínimo, 9 determinações de potência, utilizando amostras de três concentrações (baixa, média e alta), aferidas em triplicata por nível, sendo os soros preparados de forma independente (Tabela 8 ). A variação de potência não foi considerada prejudicial para o caráter de exatidão do método, de modo que o método não necessita do estabelecimento de um novo valor de corte para determinação de amostras conformes e não-conformes, ainda que as concentrações médias e baixas retornem potências inferiores às obtidas pelo teste *in vivo*.

**Tabela 8: Avaliação da exatidão do método ToBI.**

|                                    | Analista 1 |       |       | Analista 2 |       |       |
|------------------------------------|------------|-------|-------|------------|-------|-------|
| Concentração                       | ALTA       | MÉDIA | BAIXA | ALTA       | MÉDIA | BAIXA |
| Combinação pelo COMBISTATS (UI/mL) | 1343       | 955   | 807   | 1330       | 1024  | 825   |
| Média aritmética INTRA (UI/mL)     | 1333       | 953   | 803   | 1341       | 1028  | 799   |
| Desvio padrão (UI/mL)              | 30         | 22    | 33    | 42         | 99    | 49    |
| Coefficiente de Variação           | 2,3%       | 2,3%  | 4,1%  | 3,1%       | 9,6%  | 6,1%  |
| Recuperação (frente ao PRODUTOR)   | 93%        | 82%   | 80%   | 93%        | 88%   | 80%   |
| Recuperação (frente ao INCQS)      | 114%       | 92%   | 95%   | 115%       | 99%   | 95%   |

Tabela 8: **Avaliação da exatidão no método ToBi.** Aferição em triplicata de diversas concentrações afim de se obter o grau de concordância, sendo expressa pela relação percentual de recuperação, entre os resultados individuais e do produtor, devendo - se ser calculado o desvio padrão para cada concentração.

## 4. DISCUSSÃO

Neste estudo, a validação foi determinada a partir da avaliação dos parâmetros preconizados na RESOLUÇÃO RDC Nº 166, ANVISA de 2017. A validação é uma etapa necessária para a aceitação do teste ToBI no INCQS, resultando em grandes avanços com a possibilidade no uso do método para determinar a potência de soros

hiperimunes antitetânicos, de modo a minimizar e até substituir o uso do animal em testes *in vivo* (BRASIL,2017). Estima-se que, para realizar somente o teste de potência para vacinas e soros, são utilizados no INCQS em média cerca de 4.500 animais por ano, na etapa de soroneutralização. Por isso, um relatório favorável ao uso do método alternativo é um objetivo muito esperado pela comunidade científica, uma vez concluída a validação.

O material de referência que se utiliza no ensaio de soroneutralização em camundongos não apresenta resultados paralelos aos obtidos pelas amostras, devido a sensibilidade do método para pequenas variações na estrutura dos anticorpos. Como no ensaio *in vivo* o material de referência é composto de anticorpos inteiros e as amostras são fragmentadas, o perfil de inclinação das curvas varia entre os tipos de soro, dificultando o uso de um mesmo material de referência em ambos os ensaios. Assim, para o método ToBI, elegemos uma amostra de soro comercial aferida no método *in vivo* como a referência de trabalho e adotamos o material de referência do método *in vivo* como soro-controle, pois sabemos como é sua ação na placa e sua inclinação frente o espectro da diluição da amostra, com o intuito de validar o ensaio. Portanto o estabelecimento de uma referência para o teste *in vitro* foi necessário para revelar paralelismo e linearidade entre as amostras.

A validação foi positiva em todos os aspectos, demonstrando que a utilização do método no INCQS pode ser uma prática confiável na rotina de liberação de soros hiperimunes antitetânicos nos requisitos de potência, sem a demanda de estabelecimento de novo valor de corte para classificar soros antitetânicos, com uma faixa de trabalho bem estabelecida nos ensaios realizados.

## **5. CONCLUSÃO**

O presente estudo nos permite concluir que foi de extremo necessário os gráficos de controle expondo os ensaios válidos e inválidos, realizando médias para obter um resultado único e certo. O estabelecimento de um soro antitetânico de referência interna para o ensaio imunoenzimático nos mostrou eficaz, tendo uma excelente resposta após a ligação na placa. A comparação dos métodos *in vivo* e *in vitro* mostrou ótimos resultados não fugindo ao padrão estabelecido pela

Farmacopéia Européia, sendo possível a substituição dos testes. Concluímos que o método ToBI apresenta linearidade, especificidade, exatidão e precisão (intra e inter-ensaio) satisfatórias e que é um ensaio confiável, rápido e conveniente para avaliar a potência de componente tetânico presentes em soros hiperimunes.

## 6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. *et al.* **Molecular Biology of the Cell**. 6a edição. Nova Iorque: Garland Science. 2014. 1464 p.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 6a ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira*, 6ª edição, 2019. 904 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica do tétano acidental no Brasil, 2007-2016**, v. 49. Brasília, 2018.

BRASIL. **RDC N. 166, de 24 de Julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. **Diário Oficial da União**, Brasília. 22 p. 25 de julho de 2017

BRASIL. **Resolução RDC no. 73, de 21 de outubro de 2008**. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para procedimento de liberação de lotes de vacinas e soros hiperimunes heterólogos para consumo no Brasil e também para exportação. **Diário Oficial da União**, Brasília. 9 p. 22 de Outubro de 2008.

CARNEIRO VENTURA, N. J. **As Neurotoxinas de Clostridium sp. – Os mecanismos de ação e a sua importância clínica.** 2015. Disponível em: <https://bdigital.ufp.pt/handle/10284/5295?mode=simple>.

COUNCIL OF EUROPE. **European Pharmacopoeia.** 8.0 Edition. Estrasburgo: Council of Europe, EDQM. Julho de 2013.

GOMES, M. J. P. **Gênero Clostridium spp.** Favet-Ufrgs, p. 1–67, 2013. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/files/Gênero Clostridium 4-2013-1.pdf>. .

HEY, A.. History and Practice: antibodies in infectious diseases. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 2, p. 1-10. Março de 2015.

LAWAL, B. Chapter 17 - Quantal assay. In: **Applied statistical methods in Agriculture, Health and Life Sciences.** Malete (Nigéria): Springer. 2014. p 661-696.

MADIGAN, M. *et al.* **Fundamentos de genética bacteriana.** In: Brock Biología de los microorganismos, 12th Edition. Porto Alegre: ArtMed, 2009. 1160 p.

OKUMOTO, O. *et al.* **Situação epidemiológica do tétano acidental no Brasil, 2007-2016.** Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Brasil, v. 49, p. 15, 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/junho/11/2017-041-Tetano-publicacao.pdf>.

ROITT, I. *et al.* **Fundamentos de Imunologia**. 13a edição. Brasil: Guanabara Koogan. 2018. 544p.

SOLOMON, I. H.; MILNER JR, D. A. **Histopathology of vaccine-preventable diseases**. *Histopathology*, v. 70, n. 1, p. 109-122. Janeiro de 2017.

SONOBE, M. H. *et al.* **Determination of low tetanus or diphtheria antitoxin titers in sera by a toxin neutralization assay and a modified toxin-binding inhibition test**. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines**. Immunization, Vaccines and Biologicals, 2013.

YEN, L. M.; THWAITES, C. L. **Tetanus**. *The Lancet*, v. 393, n. 10181, p. 1657–1668, 2019.

