

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

Roseli Maria Domingos

**AVALIAÇÃO DA LINHAGEM DE CAMUNDONGO BALB/cAn NO ENSAIO DE  
GANHO DE PESO CORPÓREO EM CAMUNDONGOS (GPCC) QUANTO À  
SENSIBILIDADE À VACINA PERTUSSIS, TOXINA PERTUSSIS E VACINA DTP**

Rio de Janeiro

2012

Roseli Maria Domingos

**AVALIAÇÃO DA LINHAGEM DE CAMUNDONGO BALB/cAn NO ENSAIO DE GANHO DE PESO CORPÓREO EM CAMUNDONGOS (GPCC) QUANTO À SENSIBILIDADE À VACINA PERTUSSIS, TOXINA PERTUSSIS E VACINA DTP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Helena Pereira da Silva Zamith

Rio de Janeiro

2012

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Domingos, Roseli Maria

Avaliação da linhagem de camundongo BALB/cAn no ensaio de ganho de peso corpóreo em camundongos (GPCC) quanto à sensibilidade à vacina pertussis, toxina pertussis e vacina DTP./ Roseli Maria Domingos – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012.

63f.: il. tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2012.

Orientadora: Helena Pereira da Silva Zamith

1.DTP 2.Vacina pertussis 3.Ensaio de ganho de peso corpóreo em camundongos  
4.Toxina pertussis

Evaluation of the BALB/cAn mouse strain on the sensibility to pertussis vaccine, pertussis toxin and DPT vaccine in the mice weight gain test.

Roseli Maria Domingos

**AVALIAÇÃO DA LINHAGEM DE CAMUNDONGO BALB/cAn NO ENSAIO DE GANHO DE PESO CORPÓREO EM CAMUNDONGOS (GPCC) QUANTO À SENSIBILIDADE À VACINA PERTUSSIS, TOXINA PERTUSSIS E VACINA DTP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Celia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão (Doutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Marco Antonio Mota da Silva (Doutor)  
Universidade Estadual da Zona Oeste

---

Shirley de Mello Pereira Abrantes (Doutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Helena Pereira da Silva Zamith (Doutora) – Orientadora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

## AGRADECIMENTOS

À DEUS pela força e energia positiva.

A minha mãe Jurema.

Aos meus filhos Tainah e Itallo pelo incentivo.

Ao meu marido Reginaldo pelo companheirismo e incentivo.

Ao INCQS pela oportunidade de realizar este trabalho.

Aos colegas do Setor de Ensaio Toxicológicos Joel e Valdo (in memoriam) pela ajuda e dedicação para realização deste trabalho.

Ao chefe do Departamento de Farmacologia e Toxicologia, Fernando Faria Fíngola, INCQS/FIOCRUZ pelo apoio recebido.

À Dra. Helena Pereira da Silva Zamith, chefe do Laboratório de Farmacologia, do Departamento de Farmacologia e Toxicologia, INCQS/FIOCRUZ pelo apoio, amizade, orientação, ensinamentos, paciência, confiança e dedicação exclusiva para que este trabalho fosse concretizado.

Ao chefe de Serviço de Animais de Laboratório, Reginaldo Assad Miller, pelo apoio e incentivo.

À Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes e Dr. Antonio Eugenio Castro Cardoso Almeida pela força e incentivo nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Alexandre Pinto Corrado, Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, pela força.

À Dra. Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão e Dr. Marco Antonio Mota da Silva por ter aceitado participar da banca examinadora.

Sabe o que é ser forte? É ver tudo desabando ao seu redor, e ainda sim, olhar para o céu e dizer: 'tudo dará certo', é ter a certeza de que tudo é permissão de Deus, e de que ele, lá do céu controla tudo e logo a tempestade passa, a dor se acaba e a luta é vencida.

Autor desconhecido

## RESUMO

O ensaio de ganho de peso corpóreo em camundongos (GPCC) realizado para a determinação da toxicidade do componente pertussis é indispensável para aprovar o emprego da vacina DTP contra a difteria, tétano e pertussis nos Programas de Vacinação Infantil. O ensaio é satisfatório se não ocorrerem mortes, se o ganho de peso médio (GPM) dos animais no 3º dia após inoculação por via intraperitoneal for superior ao inicial e o GPM no 7º dia for igual ou maior que 60% do GPM dos animais controle. No presente estudo avaliamos em camundongos BALB/cAn e NIH de ambos os sexos, os resultados dos ensaios de GPCC da vacina pertussis de referência (VP) e da toxina pertussis fornecidas pelo National Institute for Biological Standards and Control e de 36 amostras de vacinas DTP produzidas no Brasil. Os resultados no ensaio de GPCC foram avaliados pelos critérios em vigência acima e por um novo critério de aprovação a ser proposto, que considera que no 7º dia, o GPM no limite inferior do intervalo de confiança de 95% seja igual ou maior que 60% do GPM dos animais controle. Como uma preparação de referência, a VP deve atender aos critérios de aprovação no ensaio de GPCC. Desta forma, o emprego de fêmeas NIH no GPCC mostrou-se como a melhor opção seguida pelo BALB/cAn fêmea, pois, a VP foi satisfatória em ambas as linhagens pelos critérios vigente e proposto. Diferentemente, os camundongos machos de ambas as linhagens mostraram-se inadequados para utilização no ensaio de GPCC, pois, em BALB/cAn, o resultado da VP foi insatisfatório pelo critério vigente no 7º dia e em NIH foi insatisfatória pelo critério proposto no 7º dia. Todas as amostras de vacinas DTP foram satisfatórias no ensaio de GPCC em camundongos NIH de ambos os sexos e em fêmeas BALB/cAn pelos critérios vigente e proposto. Porém, o resultado foi insatisfatório em 14% das vacinas DTP em machos BALB/cAn. Tal resultado não deve ser considerado, uma vez que machos BALB/cAn mostraram-se impróprios para uso no GPCC. O ensaio de GPCC da TP nas doses de 0,25 a 2 µg/camundongo foi satisfatório em camundongos de ambos os sexos e linhagens. Independentemente da linhagem e sexo, a TP não causou alteração do GPM, 3 dias após a sua inoculação quando comparado aos animais controle. Somente a dose de 2µg de TP em NIH machos no 7º dia causou uma significativa redução de GPM ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais controle e às menores doses de 0,25 e 0,5 µg ( $p < 0,001$ ). No 14º dia, os animais na dose de 2µg recuperaram peso, igualando-se ao

controle e o ganho de peso nas doses de 0,25 e 0,5 µg foi superior ao do controle. No 21º dia, os ganhos de peso de animais tratados se igualaram ao controle. A adoção do novo critério deve ser estimulado por aumentar a sensibilidade do ensaio de GPCC.

Palavras chave: DTP. Vacina pertussis. Ensaio de ganho de peso corpóreo em camundongos. Toxina pertussis.

## ABSTRAT

The mice weight gain test (MWGT) performed to determine the toxicity of the pertussis component is essential for the approval of the employment of the DPT vaccine against diphtheria, pertussis and tetanus in the National Children Vaccination Programs. The assay will be considered satisfactory if no deaths are reported, if the mice's average weight gain (AWG) on the 3<sup>rd</sup> day after intraperitoneal inoculation is superior to the initial weight, and if the AWG on the 7<sup>th</sup> day is equal to or higher than 60% of the AWG of the control animals. This work aims to evaluate in both sexes of BALB/cAn and NIH mice the results of the MWGT of the reference pertussis vaccine (PV) and the pertussis toxin (PT) supplied by the National Institute for Biological Standards and Control as well as the results of 36 samples of DPT vaccines produced in Brazil. The results in the MWGT were evaluated according to the current criteria above and also through a new proposed criterion of approval which considers that, on the 7<sup>th</sup> day, the AWG in the inferior limit of the 95% confidence interval should be equal to or superior to 60% of the AWG of the control mice. As a reference preparation, PV should attend all the criteria for approval in the MWGT. This way, the employment of the female NIH mice in the MWGT proved to be the best choice followed by the female BALB/cAn because PV was satisfactory for both mice strains through both the current and the proposed criteria. Differently, both male mice strains revealed to be inappropriate to be employed in the MWGT because in BALB/cAn mice the PV was unsatisfactory according to the current criteria on the 7<sup>th</sup> day, and in NIH it was unsatisfactory through the proposed criterion on the 7<sup>th</sup> day. All DTP samples were satisfactory in the MWGT in NIH mice of both sexes and in the female BALB/cAn according to the current and the proposed criteria. However, the results were unsatisfactory in 14% of DPT vaccines in male BALB/cAn. Such results should not be considered since male BALB/cAn showed to be inappropriate to be used in the MWGT. The MWGT of PT in 0,25 to 2 µg/mice was satisfactory in both strains and sexes. Independently of the mice strain and sex, PT did not cause alteration to the AWG 3 days after inoculation, when compared to control animals. Only the dose of 2 µg of PT in male NIH on 7<sup>th</sup> day caused a significant reduction of AWG ( $p < 0.05$ ) in relation to the control animals and to the smallest doses of 0,25 and 0,5 µg ( $p < 0,001$ ). On the 14<sup>th</sup> day, the animals in the dose of 2 µg recovered weight equaling the control, and the MWGT in the doses of 0,25 and 0,5 µg was superior to the

control. On the 21<sup>th</sup> day, the AWG of treated animals equaled the control. The adoption of a new criterion should be stimulated to increase the sensitivity of MWGT.

Keywords: DTP. Pertussis vaccine. Mouse weight gain test. Pertussis toxin.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Eventos adversos pós-vacinação da DTP.....	20
Quadro 2	Ensaio de GPCC em vacinas DTP(s) de células inteiras.....	23
Quadro 3	Composição e preparo da solução PBS.....	28
Figura 1	Efeito do controle PBS no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas e machos 3 e 7 dias após inoculação intraperitoneal.....	34
Figura 2	Efeito da vacina pertussis de referência 66/303 no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas e machos, 3 dias após inoculação intraperitoneal.....	36
Figura 3	Efeito da vacina pertussis de referência 66/303 no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas e machos, 7 dias após inoculação intraperitoneal.....	36
Figura 4	Efeito do controle PBS no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas 3°, 7°, 14° e 21° dias após inoculação intraperitoneal.....	41
Figura 5	Efeito do controle PBS no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/c An machos 3°, 7°, 14° e 21° dias após inoculação intraperitoneal.....	41
Figura 6	Efeito da pertussis (TP) no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas 3 dias após inoculação intraperitoneal.....	42
Figura 7	Efeito da pertussis (TP) no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn machos 3 dias após inoculação intraperitoneal.....	43
Figura 8	Efeito da pertussis (TP) na percentagem de ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas em relação ao controle 7 dias após a inoculação intraperitoneal.....	44
Figura 9	Efeito da pertussis (TP) na percentagem de ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn machos em relação ao controle 7 dias após a inoculação intraperitoneal.....	44
Figura 10	Efeito da pertussis (TP) no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas 7 dias após inoculação intraperitoneal.....	47

Figura 11	Efeito da pertussis (TP) no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas 14 dias após inoculação intraperitoneal.....	47
Figura 12	Efeito da pertussis (TP) no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn machos 7 dias após inoculação intraperitoneal.....	48
Figura 13	Efeito da pertussis (TP) no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn machos 14 dias após inoculação intraperitoneal.....	49
Figura 14	Efeito da pertussis (TP) no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas 21 dias após inoculação intraperitoneal.....	51
Figura 15	Efeito da pertussis (TP) no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn machos 21 dias após inoculação intraperitoneal.....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Ensaio de GPCC com a vacina pertussis em camundongos fêmeas e machos das linhagens NIH e BALB/cAn.....	32
Tabela 2	Ganho de peso dos animais controles da vacina pertussis fêmeas e machos das linhagens NIH e BALB/cAn 3° e 7° dias.....	33
Tabela 3	Ganho de peso dos camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas e machos 3 e 7 dias após inoculação intraperitoneal com vacina pertussis.....	35
Tabela 4	Ensaio de GPCC da TP em camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas.....	38
Tabela 5	Ensaio de GPCC da TP em camundongos NIH e BALB/cAn machos.....	39
Tabela 6	Ganho de peso das linhagens NIH e BALB/cAn fêmeas e machos 3°, 7°, 14° e 21° dias após inoculação intraperitoneal com PBS (controle).....	40
Tabela 7	Efeito da toxina pertussis (TP) em camundongos fêmeas e machos das linhagens NIH e BALB/cAn 7 dias após inoculação intraperitoneal.....	45
Tabela 8	Efeito da toxina pertussis (TP) em camundongos fêmeas e machos NIH e BALB/cAn 14 dias após inoculação intraperitoneal.....	46
Tabela 9	Efeito da toxina pertussis (TP) em camundongos fêmeas e machos NIH e BALB/cAn 21 dias após inoculação intraperitoneal.....	50
Tabela 10	Resultados do ensaio de GPCC com vacinas DTP utilizando camundongos fêmeas da linhagem NIH.....	54
Tabela 11	Resultados do ensaio de GPCC com vacinas DTP utilizando camundongos machos da linhagem NIH.....	55
Tabela 12	Resultados do ensaio de GPCC com vacinas DTP utilizando camundongos fêmeas da linhagem BALB/cAn.....	56
Tabela 13	Resultados do ensaio de GPCC com vacinas DTP utilizando camundongos machos da linhagem BALB/cAn.....	58

## LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
<i>B.pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
C	Celsius
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais de Laboratório
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DTP	Difteria, tétano e pertussis (coqueluche)
DTP <sub>a</sub>	Difteria, tétano e pertussis acelular
EP	Farmacopéia Européia
EPM	Erro padrão da média
FB	Farmacopéia Braileira
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Gramma
GPCC	Ganho de peso corpóreo em camundongos
HFA	Hemaglutinina filamentosa
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IC	Intervalo de confiança
IP	Intraperitoneal
L	Litro
Ltda	Limitada
µg	Micrograma
mL	Mililitro
mg	Miligrama
N	Normal
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
NIH	National Institute of Health
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução tampão salina-fosfato
pH	Potencial de hidrogênio
PM	Peso molecular
PO	Protocolo

POP	Procedimento Operacional Padronizado
SAL	Serviço de Animais de Laboratório
t=0	Tempo zero (leitura do peso corporal inicial)
TP	Toxina pertussis
UI	Unidade Internacional
VP	Vacina Pertussis
VPCI	Vacina pertussis de células inteiras
VPR	Vacina pertussis de referência
X	Média
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1 COQUELUCHE E VACINA DTP.....	18
1.2 EVENTOS ADVERSOS PÓS-VACINAÇÃO COM A DTP.....	19
1.3 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA BIOLÓGICA DA DTP.....	20
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	25
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	26
3.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1.1 Animais.....	26
3.1.2 Comissão de ética no Uso de Animais de Laboratório.....	26
3.2 INSUMOS E SOLUÇÕES.....	26
3.2.1 Vacina de Referência (VP).....	26
3.2.2 Vacina Tríplice Bacteriana (DTP).....	27
3.2.3 Toxina pertussis de referência (TP) e solução tampão salina-fosfato (PBS).....	27
3.2.4 Solução de timerosal.....	28
3.3 EQUIPAMENTOS, SOLUÇÕES E UTENSÍLIOS.....	28
3.4 ENSAIO DE GPCC.....	29
3.4.1 Execução do ensaio.....	29
3.4.2 Critérios de aprovação.....	29
3.5 ESTUDO DO EFEITO DA TP NO GANHO DE PESO DOS ANIMAIS DAS LINHAGENS BALB/cAn DE AMBOS OS SEXOS.....	30
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
4.1 VACINA PERTUSSIS DE REFERÊNCIA 66/303 NIBSC.....	31
4.1.1 Ensaio de GPCC.....	31
4.1.2 Avaliação do ganho de peso dos camundongos dos grupos controles (PBS) fêmeas e machos de ambas as linhagens.....	32
4.1.3 Efeito da vacina pertussis no ganho de peso corpóreo de camundongos fêmeas e machos de ambas as linhagens em relação ao controle (PBS).....	34
4.2 TOXINA PERTUSSIS.....	37

4.2.1 Ensaio de GPCC.....	37
4.2.2 Avaliação do ganho de peso dos camundongos dos grupos controles PBS fêmeas e machos de ambas as linhagens.....	40
4.2.3 Efeito da Toxina Pertussis (TP) no ganho de peso dos animais.....	42
4.3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TP NOS RESULTADOS DO ENSAIO DE GPCC DA VACINA PERTUSSIS.....	52
4.4 ENSAIO DE GPCC DA VACINA DTP.....	54
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 COQUELUCHE E A VACINA DTP

A coqueluche é uma doença infecciosa aguda transmissível, que compromete especificamente o aparelho respiratório (traquéia e brônquios). Também denominada pertussis na literatura internacional, é doença humana reconhecida há vários séculos, tendo sido relatada pela primeira vez em 1578. O agente etiológico da coqueluche *Bordetella pertussis* foi identificada em 1900, e isolada em 1906 por Bordet e Gengou, conforme revisado por Atkinson et al. em 2000. A *B.pertussis* é um coco-bacilo Gram-negativo, aeróbio, não esporulado, imóvel e pequeno, provido de cápsula (formas patogênicas) e de fímbrias (VERONESI; FOCACCIA,1999). É um patógeno bem estudado que possui um número de potentes fatores de virulência. Contudo, pouco é conhecido sobre as respostas desenvolvidas por esse microorganismo nas células humanas especialmente ao nível de transcrição gênica (BELCHER et al., 2000).

A primeira avaliação de eficácia da vacina contra coqueluche constituída por bactérias mortas foi efetuada por MADSEN (1933). Em 1942, KENDRICK publicou os resultados de estudos de campo realizados com a associação da vacina pertussis de células inteiras (VPCI) e do toxóide diftérico precipitado pelo calor. Com seu aperfeiçoamento e a possibilidade de avaliação de sua potência, a VPCI passou a ser usada em alta escala, tendo-se obtido acentuada diminuição da morbimortalidade da coqueluche nos anos subseqüentes (ATKINSON et al., 2000).

A VPCI e a vacina tríplice bacteriana ou vacina DTP (vacina contra a difteria, tétano e coqueluche) como é conhecida mundialmente, esteve no centro de controvérsias sobre a avaliação e comercialização de vacinas para crianças desde a última metade do século XX (MARTINS, 2006).

Pelo fato de ocorrerem reações adversas severas após o uso da vacina DTP, pesquisas foram realizadas por vários anos para obtenção de uma alternativa mais segura. A partir da década de 80, alguns países começaram a utilizar a vacina tríplice acelular (DTPa), que é produzida através de componentes da *B.pertussis* purificados e apresenta menor risco de ocorrência de eventos adversos (HEWLETT; CHERRY 1990; MORTINER 1994-b; LOPEZ; BLUMBERG 1997; WHO 2003-c).

A toxina pertussis (TP), componente chave da vacina DTP causa muitos efeitos biológicos em pacientes infectados e em animais de laboratório. Conseqüentemente tem recebido vários nomes, tais como, fator promotor de linfocitose, fator de sensibilização à histamina, proteína ativadora das ilhotas de Langherans e pertussígeno (VUOLO & LUSTIGMAN, 1993).

## 1.2 EVENTOS ADVERSOS PÓS-VACINAÇÃO COM A DTP

Como se pode verificar, no Quadro 1 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008), a incidência de alguns eventos adversos para vacina DTP foi muito alta, chegando três deles (reações locais, febre e irritabilidade) a ocorrer em 50% das doses aplicadas. No entanto, quase todos os eventos adversos observados têm evolução limitada, com recuperação completa, não constituindo contra indicações para a inoculação de doses subseqüentes da vacina. Eventos neurológicos graves, tais como convulsão de duração prolongada ou encefalopatia, muitas vezes indevidamente atribuídas ao componente pertussis da DTP, são raros e seu aparecimento pode corresponder apenas a um fenômeno coincidente, sem relação de causa e efeito com a vacina. Além disso, a possibilidade de que a vacina DTP induza lesões neurológicas permanentes é até hoje questionada pela maioria das autoridades no assunto, por não haver provas convincentes da existência da relação causal.

Barkin e et al (1984) concordaram que a vacina DTP tem uma taxa alta de reações adversas, citando impressionantes taxas de incidência, chegando a 93% o percentual de pacientes que apresentaram reações adversas, inclusive febre, mudança de comportamento (irritabilidade) e reações locais. Encefalopatia e sequela neurológica permanente ocorrem aproximadamente 1 em 310.000 imunizações. Outros pesquisadores concordaram que a toxina pertussis causou deficiência orgânica celular no sistema nervoso central, trazendo como consequência variações que vão da irritabilidade ao coma (Barkin et al, 1984).

QUADRO 1 - Eventos adversos após aplicação da vacina DTP\*

Eventos adversos	Freqüência	Tempo decorrente
Rubor, calor, dor, endurecimento local	1:3 a 1:2 doses	De 24 a 48 horas
Febre	1:3 a 1:2 doses	Nas primeiras 24 horas
Febre $\geq$ 39,0	1:100 doses	
Sonolência	1:5 a 1:3 doses	Ocorre nas primeiras 24 horas
Choro persistente	1:100 doses	Inicia-se entre 2 a 8 horas, prolongando-se até 48 horas após a vacina.
Irritabilidade	1:3 a 1:2 doses	Nas primeiras 24 horas
Vômito	1:16 doses	Nas primeiras 24 horas
Anorexia	1:10 a 1:5 doses	Nas primeiras 24 horas
Episódio hipotônico-hiporresponsivo (EHH)	1:1500 doses	Nas primeiras 48 horas, principalmente nas primeiras 6 horas após a vacina.
Encefalopatia	1:110.000 doses	Nos primeiros 7 dias
Convulsão	1:5.000 doses (observadas nas primeiras 48 horas)	Até 72 horas, quase sempre primeiras 12 horas.
Anafilaxia	Extremamente rara	De imediato a 2 horas
Reações imuno-alérgicas	Raras	Mais de 2 horas até dias após a aplicação da vacina
Apnéia	Ainda não estabelecida, mas parece ser freqüente, de 1/5 a 1/3, em prematuros extremos	Nas primeiras 48 horas

\*Manual de Vigilância Epidemiológica de Eventos Adversos Pós-Vacinação – MINISTÉRIO DA SAÚDE 2008

### 1.3 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA BIOLÓGICA DA DTP

Frente aos efeitos adversos e para comprovação da sua eficácia, como ocorre com as demais vacinas, ensaios biológicos são realizados com a vacina DTP visando não só a determinação da sua potência como também da sua toxicidade (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Estes ensaios são indispensáveis para aprovar o seu emprego nos Programas de Vacinação Infantil, nos quais a DTP é aplicada sob a forma de vacina tríplice adsorvida, associada com os toxóides diftérico e tetânico. Os ensaios de toxicidade aplicados ao controle da vacina DTP são de dois tipos :

1. Ensaio de toxicidade inespecífica (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010)
2. Ensaio de toxicidade específica para o componente pertussis ou ensaio de ganho de peso corpóreo em camundongos (GPCC) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

O ensaio de toxicidade inespecífica, indica através de sinais de toxicidade (perda de peso e morte) quando o produto é inoculado por via intraperitoneal (I.P.) em camundongos e cobaias, a presença de contaminantes tóxicos não inerentes ao produto, que podem ser resultantes de impurezas ou originários da degradação durante o processo de fabricação, cujo o ensaio está descrito no POP INCQS nº 65.3330.008.

O ensaio de GPCC para a determinação do componente pertussis se fundamenta na observação dos efeitos da vacina sobre a sobrevivência e o ganho de peso corporal de um grupo de camundongos inoculados com a vacina DTP em comparação com um grupo inoculados com solução salina contendo timerosal, este ensaio descrito no POP INCQS nº 65.3330.007.

O ensaio de GPCC baseia-se na constatação de Pittman que em 1952 observou uma correlação entre a diminuição da toxicidade dermonecrótica da VPCI pelo ensaio cutâneo em coelhos e pelo GPCC (PITTMAN, 1952). A determinação do peso em camundongos mostrou-se mais reprodutível do que o ensaio cutâneo em coelhos.

O trabalho original de PITTMAN (1952) somente estipula que 72 h após a imunização os cinco camundongos inoculados devem manter pelo menos seu peso médio inicial, pois o efeito dermonecrótico não é mais detectado em 72h. Este requerimento é ainda válido. Além do mais, uma relação próxima tem sido observada entre esses dois parâmetros e a inclinação da curva dose-resposta da preparação no ensaio de potência das vacinas pertussis.

As mudanças em peso correspondem ao conhecido curso de ensaios de GPCC (REDHEAD; SEARGROATT, 1986) no qual os animais inoculados perdem peso nas primeiras 24h quando comparados ao controle, mas após três dias já mostram um aumento significativamente maior do que no início do ensaio. Após sete dias, os animais inoculados alcançam os animais controle e seus pesos excedem significativamente os requeridos 60% do peso controle.

Estudos de GUPTA et al., (1988) empregando camundongos da cepa NIH e LACA, e estudos de REDHEAD & SEAGROATT (1986) corroboram com estas evidências, na qual foi empregada preparações purificadas de TP e de endotoxina mostrou-se que a endotoxina isoladamente causou perda de peso nos animais somente no primeiro dia após a vacinação, enquanto a endotoxina e TP combinadas

causaram perda de peso e mortalidade entre o terceiro e o décimo quarto dias após a vacinação. A endotoxina causa uma queda imediata do peso dos animais nas primeiras 24h que não é visualizada pela inoculação da VPCI, pois tal efeito possivelmente é mascarado pelo aumento de peso induzido pela TP nas fases iniciais do ensaio. De acordo com REDHEAD&SEAGROATT (1986), TP isolada não teve efeito sobre o peso. Entretanto, GUPTA et al., (1988) demonstraram que a preparação de TP causou perda de peso e mortalidade em dose dependente no terceiro dia em diante.

Um outro antígeno da VPCI, a hemaglutinina filamentosa (HFA) não afeta o ganho de peso em camundongos (REDHEAD & SEAGROTT, 1986; GUPTA et al,1988), porém quando inoculado em associação à TP, tende a diminuir o efeito tóxico desta última em reduzir o peso dos animais (GUPTA et al, 1988), embora a HFA, em vista da sua capacidade de promover a aderência da *B. pertussis* ao epitélio respiratório, facilita a liberação da TP.

No Departamento de Farmacologia e Toxicologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), na avaliação da toxicidade da vacina DTP foi realizado os ensaios de GPCC em camundongos NIH seguindo o Procedimento Operacional Padronizado (POP nº 65.3330.007- INCQS) e toxicidade inespecífica em camundongos Swiss Webster (POP nº 65.3330.008 - INCQS) de ambos os sexos.

Como mostra o Quadro 2, o ensaio de GPCC, rotineiramente empregado no controle da toxicidade da vacina DTP pelo produtor, deve ser também realizado em lotes finais de vacinas DTP adsorvidas, segundo as FARMACOPÉIA BRASILEIRA (FB, 2010) e a EUROPÉIA (EP, 2011) e no *bulk* final de acordo com a WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO, 2005).

No Quadro 2, também constam o número, o sexo, o peso dos camundongos, dose, controle, bem como os critérios de avaliação utilizados no ensaio de GPCC e os ensaios complementares segundo as (FB 2010), (EP 2011) e as recomendações da (WHO 2005).

QUADRO 2. Ensaio de GPCC em vacinas DTP(s) de células inteiras

Organismo	Número de camundongos	Sexo	Peso (g)	Dose	Controle	Critério	Testes complementares
Farmacopéia Brasileira 2010	No mínimo 10 albinos suíços suscetíveis	Não mencionado	14 - 16	½ dose humana 0,5 mL, ip  LOTE FINAL	0,5 mL solução fisiológica com conservante e adjuvante nas mesmas concentrações do inóculo do grupo teste	Peso total 72h ≥ inicial e ganho de peso médio 7 dias ≥ 60% do controle. Não mais que 5% de mortes	Pelo menos um dos seguintes testes: detecção de toxina dermonecrótica, linfocitose e endotoxina
Farmacopéia Européia 2011	No mínimo 5	M/F	14-16	Não menos que ½ dose humana 0,5 mL i.p  LOTE FINAL	0,5 mL solução estéril 0,9 % com preservativo na mesma concentração do inóculo grupo teste	Massa total 72h ≥ inicial e aumento médio em massa 7 dias ≥ 60% do controle. Não mais que 5% de mortes. Teste pode ser repetido e os resultados combinados	
WHO Recomendações 2005	No mínimo 10	M/F	14-16	½ dose humana 0,5 mL ip  BULK FINAL	0,5mL solução estéril 0,85% NaCl com preservativo na mesma concentração do inóculo do grupo teste	Média de peso de 72h ≥ inicial e ganho de peso médio ≥ 60% do controle. Ausência de mortes quando forem usados 10 animais e no máximo 1 morte quando usados 20. Caso seja insatisfatório possibilidade de reteste e resultados válidos combinados	Monitoramento da toxina pertussis pelo ensaio em células CHO e ensaio de sensibilização à histamina e endotoxina

Um estudo interlaboratorial conduzido em 1991 pelo Rijksinstituut Voor Volksgezondheid en Milieuhygiene em Bilthoven, Holanda, com 6 diferentes vacinas DTP e com a participação de 14 laboratórios, mostrou que o ensaio de GPCC teve pouca reprodutibilidade interlaboratorial. Os resultados publicados (VAN STRAATEN; VAN DE KAPPELLE et al., 1997) mostraram uma variação interlaboratorial de aproximadamente 30% (o ganho de peso no 7º dia ficou na faixa de 60 a 160%).

A alta variabilidade do ganho de peso que ocorreu, apesar do uso de camundongos controle, foi principalmente atribuído ao fato de que diferentes linhagens de camundongos foram usadas pelos laboratórios.

Poucos dados são usualmente disponíveis sobre a variabilidade intralaboratorial porque o ensaio de GPCC é raramente conduzido mais do que uma vez numa preparação.

Entretanto, o estudo mencionado acima, recomendou que cada laboratório fizesse um ensaio duplo. Os dados obtidos pelo Instituto Paul-Erlich, também participante do estudo, mostrou que a variabilidade intralaboratorial foi também alta. Algumas preparações que dificilmente alcançaram o requerimento para 60% de ganho de peso no primeiro ensaio, uma semana mais tarde, no segundo ensaio ocasionaram um ganho de peso acima de 100%.

Adicionalmente, foi avaliado os dados obtidos do SKIA (STAATL. Serum Kontrollinstitut) na antiga República Democrática Alemã, entre 1987 e 1989. O ensaio de GPCC foi usado como ensaio de rotina de vários bulks de vacina DTP e foi repetido várias vezes.

Os ensaios seguiram todos os requerimentos da Farmacopéia Européia, como por exemplo, quanto ao peso inicial dos camundongos que deve estar entre 14 a 16 g, entretanto, os pesos iniciais dos animais controle e do ensaio foi comparável em todos os estudos, e, conseqüentemente foi válido se comparar ganhos de peso em diferentes ensaios.

Entretanto, foi confirmado que a linhagem de camundongo influencia o resultado do ensaio de GPCC. Sob as mesmas condições de ensaio, camundongos NMRI mostrou um menor ganho de peso do que os camundongos ICR e a maioria das mortes ocorreu em camundongos ICR. Diferentes linhagens de camundongos deram origem a faixas completamente diferentes de lotes individuais.

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da linhagem de camundongo BALB/cAn no resultado obtido pelo ensaio de GPCC na vacina DTP.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar o ensaio de GPCC em camundongos das linhagens BALB/cAn e NIH de ambos os sexos para avaliação da toxicidade da TP, vacina pertussis de referência (VPR) e vacina DTP.
2. Comparar os resultados no ensaio de GPCC obtidos com os camundongos da linhagem BALB/cAn, com os obtidos em camundongos da linhagem NIH.
3. Propor novo critério de aprovação no ensaio de GPCC baseado no valor do limite inferior do intervalo de confiança ( $p=0,05$ ) do ganho de peso médio do grupo inoculado no 7º dia com a vacina maior ou igual a 60% do ganho de peso dos animais do grupo controle.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 MATERIAL E MÉTODOS

##### 3.1.1 Animais

Camundongos das linhagens NIH e BALB/cAn de ambos os sexos, com peso entre 14 e 16 g, foram divididos em grupos de 10 animais, alojados em caixas de polipropileno com tampa de aço inoxidável (30 cm x 19 cm x 1cm) e cama de maravalha de *pinus* e aclimatados no mínimo por 24 horas antes do início do experimento. Os animais são originários do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Os animais foram mantidos no Serviço de Animais de Laboratório (SAL/INCQS) com controle de temperatura ambiental de  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ , umidade relativa do ar de aproximadamente 70% e ciclo claro-escuro de 12 horas, receberam água e ração comercial para camundongos (Nuvilab-Nuvital Ltda.,Paraná). As trocas de cama e água foram realizadas duas vezes por semana e a ração repostada diariamente, de acordo com os POPs do INCQS nº 65.3340.002 Boas Práticas em Experimentação Animal e nº 65.3340.004 Identificação de Caixas e Gaiolas.

##### 3.1.2 Comissão de ética no Uso de Animais de Laboratório – CEUA/FIOCRUZ

A solicitação de licença de projeto foi obtida junto a CEUA/FIOCRUZ sob o número de protocolo **P0111-02**.

#### 3.2 INSUMOS E SOLUÇÕES

##### 3.2.1 Vacina de Referência (VP)

Neste estudo foi utilizado o Terceiro Padrão Internacional para Vacina Pertussis fornecido pelo *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC) código 66/303, apresentando uma potência de 46 UI de vacina pertussis por ampola, sob a forma liofilizada. Antes do seu uso foi diluída em 8 mL de solução PBS para se obter a mesma concentração como nas vacinas teste no ensaio de GPCC, de meia dose humana/0,5mL. O volume de 0,5mL da vacina reconstituída foi inoculada nos camundongos por via intraperitoneal.

### 3.2.2 Vacina Tríplice Bacteriana (DTP)

A vacina DTP é uma suspensão composta pelos toxóides diftérico e tetânico purificados combinados com a vacina contra a pertussis (coqueluche) adsorvidos por hidróxido de alumínio e adicionado preservativo o timerosal. Conforme descrito na bula da vacina DTP cada dose 0,5 mL contém antígenos diftérico e tetânico suficientes para indução de 2 UI de antitoxina em cobaia, 4 UI de antígeno pertussis (coqueluche), hidróxido de alumínio (até 1,25 mg em alumínio), timerosal até 20 mg e solução fisiológica tamponada pH 6,4 em quantidade suficiente para 0,5 mL. Antes da inoculação por via intraperitoneal no volume de 0,5mL/camundongo, a vacina foi diluída na proporção de 1:1 com solução de cloreto de sódio 0,9%. A solução de cloreto de sódio a 0,9% contendo 100 ppm de timerosal (utilizado como controle no ensaio de GPCC), foi inoculado pela via intraperitoneal em volume idêntico ao da vacina POP nº 65.3330.007 (INCQS).

Utilizamos para este estudo 36 lotes de vacinas DTP, que entraram no INCQS junho 2006 a junho de 2007 de um único produtor nacional.

### 3.2.3 Toxina pertussis de referência (TP) e solução PBS

A TP é um extrato obtido do sobrenadante de cultura de *B. pertussis*, fornecida pelo NIBSC código 90/518 em ampolas, cada uma contendo o equivalente a 20µg de TP liofilizada. Na preparação da solução de TP foi utilizada 4 ampolas, que foram reconstituídas com volume final de 20mL de solução PBS. As diluições seguintes da solução de TP (4µg/mL) foram preparadas com PBS. A solução de TP em PBS foi inoculada por via intraperitoneal no volume de 0,5mL em 4 doses (0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 µg/camundongo).

A solução PBS, preparada segundo fórmula que pode ser observado no quadro e o procedimento abaixo, foi empregada como controle negativo sendo inoculado por via intraperitoneal no volume de 0,5 mL.

QUADRO 3. Composição e preparo da solução PBS

Cloreto de sódio	(PM 58,44)	8,0 g
Cloreto de potássio	(PM 74,55)	0,2 g
Fosfato de sódio dibásico	(PM 141,96)	1,2 g
Fosfato de potássio monobásico	(PM 136,09)	0,2 g
Água desionizada		1,0 L

Procedimento de preparação da solução PBS:

- a) dissolução dos sais em água, com agitação magnética;
- b) ajuste ao pH 7,4 com ácido clorídrico 1N ou hidróxido de sódio 1N;
- c) esterilização por autoclavação durante 30 min.

#### 3.2.4 Solução de timerosal

No **grupo controle** do ensaio de GPCC das vacinas DTP foi utilizado **a solução de timerosal** (Sigma: 5125, lote 59H0352) 100µg/mL em solução de cloreto de sódio 0,9 %.

### 3.3 EQUIPAMENTOS, SOLUÇÕES E UTENSÍLIOS

- Agitador de tubo;
- Agulha e seringa descartável ;
- Álcool 70%;
- Balança semi-analítica;
- Cabine de segurança biológica;
- Capela para eutanásia acoplada ao cilindro de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e utilizada de acordo com o POP INCQS nº 65.3340.008;
- Solução reagente de trinitrofenol (ácido pícrico) 1% para marcação de animal POP INCQS nº 65.3300.002;
- Tubo de ensaio.

### 3.4 ENSAIO DE GPCC

O ensaio de GPCC nas linhagens NIH e BALB/cAn de ambos os sexos foi realizado de acordo com o POP do INCQS nº 65.3330.007, seguindo as recomendações da Farmacopéia Brasileira (2010) e Européia (2011).

#### 3.4.1 Execução do ensaio

Os animais foram pesados e marcados individualmente, seguindo os POPs do INCQS nº 65.3300.005, Determinação do Peso Corporal de Animais de Laboratório e nº 65.3300.002, Marcação Padrão de Animais de Laboratório. Os animais foram separados aleatoriamente em grupos de dez. Seus pesos individuais foram anotados no protocolo de ensaio, correspondente ao  $t = 0$ . Cada grupo contendo 10 animais foram inoculados por via intraperitoneal com volume de 0,5mL de vacina DTP, VP e de TP nas doses mencionadas em 3.2.3. Um grupo de 10 animais foram inoculados por via intraperitoneal com volume de 0,5 mL de solução fisiológica contendo 100ppm de timerosal (controle da vacina DTP), e outro grupo de 10 animais foram inoculados por via intraperitoneal com volume de 0,5mL de PBS (controle VP e TP). Os pesos dos animais foram anotados no protocolo de ensaio, correspondentes aos 3º e 7º dias após a inoculação da vacina DTP, VP e TP e de seus respectivos controles. Os animais foram observados diariamente durante o período do ensaio.

#### 3.4.2 Critérios de aprovação

Para a amostra ser considerada satisfatória:

- a) no 3º dia, o peso total do grupo inoculado com a vacina DTP, vacina VP ou TP não for menor que seu peso total inicial;
- b) no 7º dia, o ganho de peso médio do grupo inoculado com a vacina DTP, vacina VP ou TP não for menor que 60% do ganho de peso médio do grupo controle;
- c) não ocorrer mortes de animais;
- d) e o limite inferior do intervalo de confiança do ganho de peso médio do grupo inoculado com vacina DTP ou VP ou TP tem que ser igual ou maior a 60% do ganho de peso dos animais do grupo controle como critério proposto a partir da monografia

de especialização “Avaliação do Ensaio de Ganho de Peso em Camundongos no Controle da Qualidade da Vacina Tríplice Bacteriana – DTP” (Domingos, 2006).

### 3.5 ESTUDO DO EFEITO DA TP NO GANHO DE PESO DOS ANIMAIS DAS LINHAGENS NIH E BALB/cAn DE AMBOS OS SEXOS

Na avaliação da toxicidade da TP além da observação no 3<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dias após a inoculação, os animais foram acompanhados quanto ao ganho de peso e ocorrência de morte por um período adicional de 14 e 21 dias.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na avaliação do efeito da VP no ganho de peso dos camundongos de ambos os sexos das linhagens NIH e BALB/cAN utilizou-se o teste t de *Student* não pareado monocaudal ao nível de significância de  $p=0,05$  precedido do teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação da normalidade.

No estudo do efeito das 4 doses de TP em relação ao controle (PBS) utilizou-se a análise de variância (*ANOVA one way*) precedido pelo teste para verificação da normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e do teste para verificação da homocedasticidade (teste de Bartlett). Uma vez detectada uma diferença estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ) pela *ANOVA one way* empregou-se os testes de comparações múltiplas de Tukey e de Dunnett.

O programa computacional *GraphPad Prism*<sup>®</sup> 3.0 foi a ferramenta para aplicação dos testes estatísticos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. VACINA PERTUSSIS DE REFERÊNCIA 66/303 NIBSC

#### 4.1.1 Ensaio de GPCC

A Tabela 1 mostra os valores de ganho de peso dos animais no 3° e 7° dias após inoculação por via intraperitoneal com a vacina pertussis de referência no volume de 0,5 mL/camundongos em fêmeas e machos das linhagens. O resultado do ensaio GPCC foi satisfatório em camundongos fêmeas de ambas as linhagens e em machos da cepa NIH, porém insatisfatório em BALB/cAn macho. O peso total dos animais no 3° dia foi superior ao peso total inicial para todos os grupos em ambos sexos e linhagens. No 7° dia, o percentual de ganho de peso médio de todos os grupos foram superior a 60% ao do grupo controle PBS, com exceção do BALB/cAn macho com percentual inferior a 60 %. Não houve ocorrência de mortes no período de sete dias de ensaio. A vacina pertussis seria também insatisfatória em NIH machos, ao se considerar como critério de aprovação o limite inferior do intervalo de confiança ( $p=0,05$ ) para a percentagem de ganho de peso superior a 60 %.

A diferença entre os percentuais de ganho de peso médio em relação ao controle (Tabela 1), 7 dias após a inoculação da vacina pertussis em camundongos machos de ambas linhagens não diferiram significativamente ( $p>0,05$ ) pelo teste t de *Student*. Porém, em fêmeas BALB/cAn houve uma redução altamente significativa ( $p< 0,01$ ) no percentual de ganho de peso no 7° dia em relação às fêmeas NIH.

**Tabela 1**

Ensaio de GPCC<sup>1</sup> com a vacina pertussis<sup>2</sup> em camundongos fêmeas e machos das linhagens NIH e BALB/cAn

Ganho de peso <sup>3</sup> (g) - 3ºdia				Percentagem de ganho de peso <sup>4</sup> - 7ºdia				Ganho de peso <sup>3</sup> (g) - 3ºdia				Percentagem de ganho de peso <sup>4</sup> - 7ºdia																																																																																																																											
NIH fêmea		BALB fêmea		NIH fêmea		BALB Fêmea		NIH macho		BALB macho		NIH macho		BALB macho																																																																																																																									
3,1	1,2	143,6	112,5	1,0	1,0	72,1	82,7	0,5	1,0	92,7	102,5	4,0	1,8	103,5	69,2	2,0	0,3	116,4	87,5	1,7	0,8	94,2	80,8	0,5	0,4	70,9	35,0	1,1	-0,4	69,8	7,7	1,5	0,6	116,4	77,5	1,1	0,5	65,1	44,2	3,7	1,4	134,5	100,0	0,9	0,9	55,8	105,8	2,0	1,1	107,3	75,0	0,9	0,7	60,5	57,7	1,7	0,6	112,7	65,0	1,1	1,0	50,0	59,6	0,2	2,0	87,3	90,0	1,0	0,8	59,3	46,2	3,7	0,4	120,0	55,0	1,9	-0,3	108,1	25,0	Média e intervalo de confiança 95%																1,9	0,9	110,2	80,0	1,5	0,7	73,8	57,9	(0,9-2,8)	(0,5-1,3)	(94,6-125,8)	63,1-96,9)	(0,8-2,1)	(0,2-1,1)	(59,0-88,6)	(37,2-78,5)	Média e erro padrão da média																1,9 ± 0,4	0,9 ± 0,2	110,2 ± 6,9	80,0 ± 7,5	1,5 ± 0,3	0,7 ± 0,2	73,8 ± 6,5	57,9 ± 9,1
2,0	0,3	116,4	87,5	1,7	0,8	94,2	80,8	0,5	0,4	70,9	35,0	1,1	-0,4	69,8	7,7	1,5	0,6	116,4	77,5	1,1	0,5	65,1	44,2	3,7	1,4	134,5	100,0	0,9	0,9	55,8	105,8	2,0	1,1	107,3	75,0	0,9	0,7	60,5	57,7	1,7	0,6	112,7	65,0	1,1	1,0	50,0	59,6	0,2	2,0	87,3	90,0	1,0	0,8	59,3	46,2	3,7	0,4	120,0	55,0	1,9	-0,3	108,1	25,0	Média e intervalo de confiança 95%																1,9	0,9	110,2	80,0	1,5	0,7	73,8	57,9	(0,9-2,8)	(0,5-1,3)	(94,6-125,8)	63,1-96,9)	(0,8-2,1)	(0,2-1,1)	(59,0-88,6)	(37,2-78,5)	Média e erro padrão da média																1,9 ± 0,4	0,9 ± 0,2	110,2 ± 6,9	80,0 ± 7,5	1,5 ± 0,3	0,7 ± 0,2	73,8 ± 6,5	57,9 ± 9,1																
0,5	0,4	70,9	35,0	1,1	-0,4	69,8	7,7	1,5	0,6	116,4	77,5	1,1	0,5	65,1	44,2	3,7	1,4	134,5	100,0	0,9	0,9	55,8	105,8	2,0	1,1	107,3	75,0	0,9	0,7	60,5	57,7	1,7	0,6	112,7	65,0	1,1	1,0	50,0	59,6	0,2	2,0	87,3	90,0	1,0	0,8	59,3	46,2	3,7	0,4	120,0	55,0	1,9	-0,3	108,1	25,0	Média e intervalo de confiança 95%																1,9	0,9	110,2	80,0	1,5	0,7	73,8	57,9	(0,9-2,8)	(0,5-1,3)	(94,6-125,8)	63,1-96,9)	(0,8-2,1)	(0,2-1,1)	(59,0-88,6)	(37,2-78,5)	Média e erro padrão da média																1,9 ± 0,4	0,9 ± 0,2	110,2 ± 6,9	80,0 ± 7,5	1,5 ± 0,3	0,7 ± 0,2	73,8 ± 6,5	57,9 ± 9,1																								
1,5	0,6	116,4	77,5	1,1	0,5	65,1	44,2	3,7	1,4	134,5	100,0	0,9	0,9	55,8	105,8	2,0	1,1	107,3	75,0	0,9	0,7	60,5	57,7	1,7	0,6	112,7	65,0	1,1	1,0	50,0	59,6	0,2	2,0	87,3	90,0	1,0	0,8	59,3	46,2	3,7	0,4	120,0	55,0	1,9	-0,3	108,1	25,0	Média e intervalo de confiança 95%																1,9	0,9	110,2	80,0	1,5	0,7	73,8	57,9	(0,9-2,8)	(0,5-1,3)	(94,6-125,8)	63,1-96,9)	(0,8-2,1)	(0,2-1,1)	(59,0-88,6)	(37,2-78,5)	Média e erro padrão da média																1,9 ± 0,4	0,9 ± 0,2	110,2 ± 6,9	80,0 ± 7,5	1,5 ± 0,3	0,7 ± 0,2	73,8 ± 6,5	57,9 ± 9,1																																
3,7	1,4	134,5	100,0	0,9	0,9	55,8	105,8	2,0	1,1	107,3	75,0	0,9	0,7	60,5	57,7	1,7	0,6	112,7	65,0	1,1	1,0	50,0	59,6	0,2	2,0	87,3	90,0	1,0	0,8	59,3	46,2	3,7	0,4	120,0	55,0	1,9	-0,3	108,1	25,0	Média e intervalo de confiança 95%																1,9	0,9	110,2	80,0	1,5	0,7	73,8	57,9	(0,9-2,8)	(0,5-1,3)	(94,6-125,8)	63,1-96,9)	(0,8-2,1)	(0,2-1,1)	(59,0-88,6)	(37,2-78,5)	Média e erro padrão da média																1,9 ± 0,4	0,9 ± 0,2	110,2 ± 6,9	80,0 ± 7,5	1,5 ± 0,3	0,7 ± 0,2	73,8 ± 6,5	57,9 ± 9,1																																								
2,0	1,1	107,3	75,0	0,9	0,7	60,5	57,7	1,7	0,6	112,7	65,0	1,1	1,0	50,0	59,6	0,2	2,0	87,3	90,0	1,0	0,8	59,3	46,2	3,7	0,4	120,0	55,0	1,9	-0,3	108,1	25,0	Média e intervalo de confiança 95%																1,9	0,9	110,2	80,0	1,5	0,7	73,8	57,9	(0,9-2,8)	(0,5-1,3)	(94,6-125,8)	63,1-96,9)	(0,8-2,1)	(0,2-1,1)	(59,0-88,6)	(37,2-78,5)	Média e erro padrão da média																1,9 ± 0,4	0,9 ± 0,2	110,2 ± 6,9	80,0 ± 7,5	1,5 ± 0,3	0,7 ± 0,2	73,8 ± 6,5	57,9 ± 9,1																																																
1,7	0,6	112,7	65,0	1,1	1,0	50,0	59,6	0,2	2,0	87,3	90,0	1,0	0,8	59,3	46,2	3,7	0,4	120,0	55,0	1,9	-0,3	108,1	25,0	Média e intervalo de confiança 95%																1,9	0,9	110,2	80,0	1,5	0,7	73,8	57,9	(0,9-2,8)	(0,5-1,3)	(94,6-125,8)	63,1-96,9)	(0,8-2,1)	(0,2-1,1)	(59,0-88,6)	(37,2-78,5)	Média e erro padrão da média																1,9 ± 0,4	0,9 ± 0,2	110,2 ± 6,9	80,0 ± 7,5	1,5 ± 0,3	0,7 ± 0,2	73,8 ± 6,5	57,9 ± 9,1																																																								
0,2	2,0	87,3	90,0	1,0	0,8	59,3	46,2	3,7	0,4	120,0	55,0	1,9	-0,3	108,1	25,0	Média e intervalo de confiança 95%																1,9	0,9	110,2	80,0	1,5	0,7	73,8	57,9	(0,9-2,8)	(0,5-1,3)	(94,6-125,8)	63,1-96,9)	(0,8-2,1)	(0,2-1,1)	(59,0-88,6)	(37,2-78,5)	Média e erro padrão da média																1,9 ± 0,4	0,9 ± 0,2	110,2 ± 6,9	80,0 ± 7,5	1,5 ± 0,3	0,7 ± 0,2	73,8 ± 6,5	57,9 ± 9,1																																																																
3,7	0,4	120,0	55,0	1,9	-0,3	108,1	25,0																																																																																																																																
Média e intervalo de confiança 95%																																																																																																																																							
1,9	0,9	110,2	80,0	1,5	0,7	73,8	57,9	(0,9-2,8)	(0,5-1,3)	(94,6-125,8)	63,1-96,9)	(0,8-2,1)	(0,2-1,1)	(59,0-88,6)	(37,2-78,5)																																																																																																																								
Média e erro padrão da média																																																																																																																																							
1,9 ± 0,4	0,9 ± 0,2	110,2 ± 6,9	80,0 ± 7,5	1,5 ± 0,3	0,7 ± 0,2	73,8 ± 6,5	57,9 ± 9,1																																																																																																																																

<sup>1</sup>Ganho de peso corpóreo de camundongos.

<sup>2</sup>Vacina pertussis NIBSC 66/303

<sup>3</sup>Ganho de peso em relação ao peso inicial

<sup>4</sup>Percentagem de ganho de peso em relação ao grupo controle PBS

#### 4.1.2 Avaliação do ganho de peso dos camundongos dos grupos controle (PBS) fêmeas e machos de ambas as linhagens.

Dados dos grupos controles de fêmeas e machos de ambas as linhagens, 3º e 7º dias após inoculação do PBS seguiram uma distribuição normal e são mostrados na Tabela 2.

**Tabela 2**

Ganho de peso<sup>1</sup> (g) dos animais controles da vacina pertussis fêmeas e machos das linhagens NIH e BALB/cAn

3ºdia		7ºdia		3ºdia		7ºdia	
NIH fêmea	BALB fêmea	NIH fêmea	BALB fêmea	NIH macho	BALB macho	NIH macho	BALB macho
2,5	2,5	4,9	5,1	2,5	1,4	8,2	5,7
5,0	2,4	10,7	4,1	2,2	0,9	9,4	3,5
2,1	1,0	5,7	2,3	3,6	2,2	10,7	6,4
3,4	2,3	7,2	5,6	4,2	1,1	10,9	3,3
1,7	3,1	5,1	4,8	3,4	1,6	8,0	3,6
2,5	0,8	3,2	2,0	4,1	1,8	10,1	3,4
1,2	2,9	3,3	5,8	2,6	3,2	8,0	7,9
0,6	1,3	2,7	3,0	3,1	2,7	7,7	6,8
4,0	0,6	5,4	3,1	2,9	1,9	8,9	6,3
4,0	2,2	6,9	4,1	1,8	1,3	3,6	4,7

Média e intervalo de confiança 95%

2,7 ( 1,7-3,7) 1,9 (1,3-2,6) 5,5 (3,8-7,2) 4,0 (3,0-4,9) 3,0 (2,5-3,6) 1,8 (1,3-2,3) 8,5(7,0-10,0) 5,1 (4,0-6,3)

Média e erro padrão da média

2,7 ± 0,4 1,9 ± 0,3 5,5 ± 0,7 4,0 ± 0,4 3,0 ± 0,2 1,8 ± 0,2 8,5 ± 0,7 5,1 ± 0,5

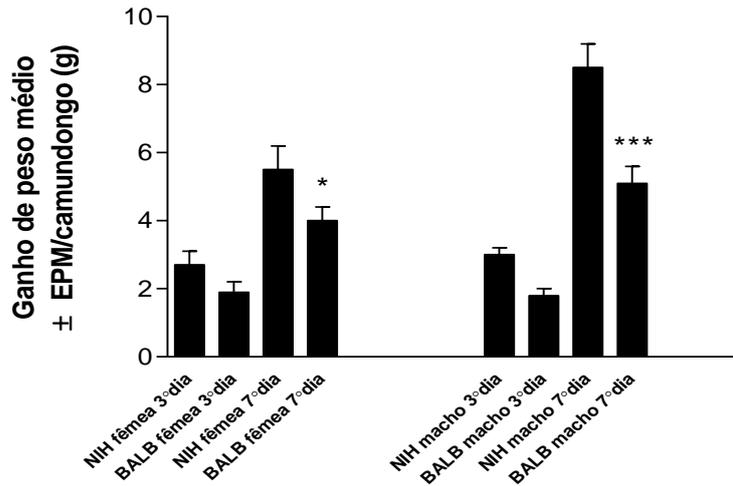
<sup>1</sup>Ganho de peso corpóreo de camundongos

<sup>2</sup>Vacina pertussis de referência NIBSC 66/303

<sup>3</sup>Ganho de peso em relação ao peso inicial

Três dias após a inoculação por via intraperitoneal com PBS, os ganhos de peso médios das fêmeas controles de ambas as linhagens não foram significativamente diferentes pelo teste t de Student ( $p > 0,05$ ); porém no período de 7 dias as fêmeas NIH mostrou ganho de peso médio ligeiramente superior ao das fêmeas BALB/cAn ( $p = 0,0473$ ). Após o 3º e 7º dias, o ganho de peso médio dos machos controle BALB/cAn foi cerca de 1,6 vezes inferiores ( $p < 0,001$ ) ao ganho de peso dos machos NIH. Conforme mostrado na Figura 1.

Figura 1 Efeito do controle PBS no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas e machos 3 e 7 dias após inoculação intraperitoneal. Barras indicam erro padrão da média (EPM) do ganho de peso médio de 10 animais. \*\*\*indica diferença extremamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre as duas linhagens do mesmo sexo pelo teste t de *Student*.



4.1.3 Efeito da vacina pertussis no ganho de peso corpóreo de camundongos fêmeas e machos de ambas as linhagens em relação ao controle (PBS).

Os dados da Tabela 2 referentes ao controle e da Tabela 3 relativos aos animais inoculados com a vacina pertussis seguiram uma distribuição normal para ambos sexos e linhagens.

Tabela 3

Ganho de peso <sup>1</sup> (g) dos camundongos NIH e BALB/c An fêmeas e machos 3 e 7 dias após inoculação intraperitoneal com vacina pertussis <sup>2</sup>							
3ºdia		7ºdia		3ºdia		7ºdia	
NIH fêmea	BALB fêmea	NIH fêmea	BALB fêmea	NIH macho	BALB macho	NIH macho	BALB macho
3,1	1,2	7,9	4,5	1,0	1,0	6,2	4,3
0,5	1,0	5,1	4,1	4,0	1,8	8,9	3,6
2,0	0,3	6,4	3,5	1,7	0,8	8,1	4,2
0,5	0,4	3,9	1,4	1,1	-0,4	6,0	0,4
1,5	0,6	6,4	3,1	1,1	0,5	5,6	2,3
3,7	1,4	7,4	4,0	0,9	0,9	4,8	5,5
2,0	1,1	5,9	3,0	0,9	0,7	5,2	3,0
1,7	0,6	6,2	2,6	1,1	1,0	4,3	3,1
0,2	2,0	4,8	3,6	1,0	0,8	5,1	2,4
3,7	0,4	6,6	2,2	1,9	-0,3	9,3	1,3
Média e intervalo de confiança 95%							
1,9(1,0-2,8)	0,9(0,5-1,3)	6,1(5,2-6,9)	3,2(2,5-3,9)	1,5(0,8-2,1)	6,3(5,1-7,6)	0,7(0,2-1,1)	3,0(1,9-4,1)
Média e erro padrão da média							
1,9 ± 0,4	0,9 ± 0,2	6,1 ± 0,4	3,2 ± 0,3	1,5 ± 0,8	6,3 ± 0,6	0,7 ± 0,2	3,0 ± 0,5

<sup>1</sup>Ganho de peso corpóreo de camundongos

<sup>2</sup>Vacina pertussis de referência NIBSC 66/303

A Figura 2 mostra que três dias após a inoculação por via intraperitoneal, em camundongos fêmeas NIH, a vacina não causou perda de peso significativa ( $p > 0,05$ ) pelo teste t de *Student* em relação ao controle, porém em fêmeas BALB/c An a vacina causou perda de peso altamente significativa ( $p < 0,01$ ). Porém, após sete dias (Figura 3), a vacina não causou perda de peso significativa em fêmeas das linhagens NIH ( $p > 0,1$ ) e BALB/c An ( $p > 0,05$ ).

Diferentemente das fêmeas, no 3º e 7º dias, em camundongos machos de ambas as linhagens, a vacina causou, perda de peso significativa em relação ao controle (Figuras 2 e 3). A perda de peso no 3º dia foi extremamente significativa para ambas as linhagens ( $p < 0,001$ ) e no 7º dia, a perda de peso causada pela vacina em NIH foi significativa ( $p > 0,05$ ) e em BALB/c An foi altamente significativa ( $p < 0,01$ ).

Figura 2 - Efeito da vacina pertussis de referência 66/303 no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/c An fêmeas e machos, 3 dias após inoculação intraperitoneal. Barras indicam o erro padrão da média (EPM) do ganho de peso médio de 10 animais. \*\*indica diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ ) e \*\*\*indica diferença extremamente significativa ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle PBS pelo teste t de *Student*.

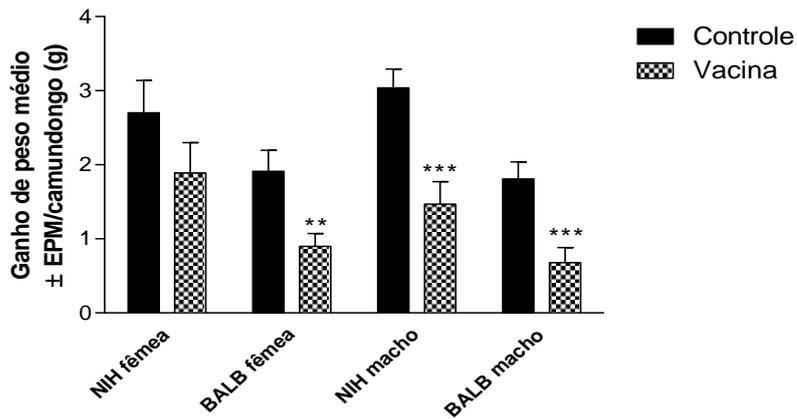
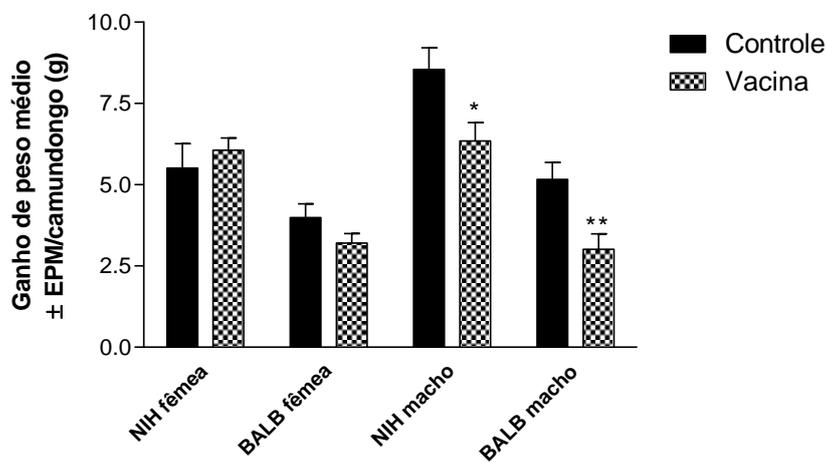


Figura 3. Efeito da vacina pertussis de referência 66/303 no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas e machos 7 dias após inoculação intraperitoneal. Barras indicam o erro padrão da média do ganho de peso médio de 10 animais. \*indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e \*\*indica diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ ) em relação ao controle PBS pelo teste t de *Student*.



No Procedimento Operacional Padrão do NIBSC que preconiza o ensaio de GPCC em NIH fêmeas (National Institute for Biological Standards and Control), a vacina pertussis 66/303 é empregada como preparação de referência devendo atender aos critérios de aprovação no ensaio de GPCC o que se confirmou em nosso estudo.

O emprego de fêmeas NIH no GPCC mostrou-se como a melhor opção seguida pelo BALB/cAn fêmea. A vacina não causou perda de peso em fêmeas NIH em relação ao controle. Em fêmeas BALB/cAn apesar da vacina ter causado perda de peso no 3° dia em relação ao controle, tal perda não foi suficiente para reprovar a vacina no ensaio de GPCC e no 7° dia, os animais ganharam peso o suficiente igualando-se ao controle.

Os camundongos machos de ambas as linhagens mostrou-se inadequados para utilização no ensaio de GPCC da vacina, pois, em BALB/cAn o resultado foi insatisfatório no critério em vigência e no NIH no critério proposto.

## 4.2 TOXINA PERTUSSIS

### 4.2.1 Ensaio de GPCC

As Tabelas 4 e 5 mostram que a TP inoculada por via intraperitoneal na faixa de doses de 0,25 a 2,0µg/camundongo nas linhagens NIH e BALB/cAn fêmeas e machos foi satisfatória quanto ao ensaio de GPCC, pois o ganho de peso médio dos camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas e machos no 3° dia foi superior ao inicial, e no 7° dia, o percentual de ganho de peso médio dos referidos grupos tratados pela TP em ambas as linhagens e sexos foi superior a 60% ao do grupo controle (PBS).

Tabela 4

Ensaio de GPCC<sup>1</sup> da TP<sup>2</sup> em camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas

NIH ganho de peso <sup>3</sup> (g) - 3 <sup>o</sup> dia					NIH % de ganho de peso <sup>4</sup> - 7 <sup>o</sup> dia			
Doses de TP (µg) /camundongo					Doses de TP (µg) /camundongo			
PBS <sup>5</sup>	0,25	0,5	1,0	2,0	0,25	0,5	1,0	2,0
3,1	1,3	3,7	4,8	2,8	43,9	109,1	139,4	109,1
3,7	3,5	4,1	2,4	3,2	77,3	124,2	100,0	83,3
3,6	3,4	3,8	3,9	2,1	110,6	125,7	90,9	47,0
3,5	3,0	3,9	4,1	2,0	103,0	116,7	127,3	54,5
4,6	3,4	3,2	3,0	3,1	115,1	80,3	118,2	75,7
2,7	5,4	4,1	2,3	2,9	133,3	77,3	65,1	110,6
4,4	3,3	4,2	3,3	3,6	106,1	154,5	151,5	122,7
4,2	3,4	3,9	2,6	1,3	137,9	160,6	95,4	26,0
3,4	3,4	2,3	2,5	2,7	66,7	110,6	45,4	100,0
4,5	3,6	2,5	2,6	4,3	121,2	92,4	56,1	98,5

## Média e intervalo de confiança 95%

3,8 (3,4-4,2)	3,4 (2,8-4,0)	3,6 (3,2-4,0)	3,2 (2,7-3,7)	2,8 (2,0-3,6)	101,5 (80,0-123,0)	115,1 (95,1-135,1)	98,9 (73,4-124,5)	82,7 (60,2-105,3)
------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	-----------------------	-----------------------	----------------------	----------------------

## Média e erro padrão da média

3,8 ± 0,2	3,4 ± 0,3	3,6 ± 0,2	3,2 ± 0,3	2,8 ± 0,3	101,5 ± 9,5	115,1 ± 8,8	98,9 ± 11,3	82,7 ± 10,0
-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-------------	-------------	-------------	-------------

BALB/cAn ganho de peso <sup>3</sup> (g) - 3 <sup>o</sup> dia					BALB/cAn % de ganho de peso <sup>4</sup> - 7 <sup>o</sup> dia			
Doses de TP (µg) /camundongo					Doses de TP (µg) /camundongo			
PBS <sup>5</sup>	0,25	0,5	1,0	2,0	0,25	0,5	1,0	2,0
2,7	3,8	3,8	0,9	2,1	167,6	162,2	45,9	145,9
3,0	2,2	2,4	2,2	2,4	124,3	145,9	143,2	116,2
2,2	3,2	4,2	3,3	1,4	178,4	151,3	135,1	51,3
1,5	2,3	3,9	2,8	2,7	129,7	197,3	108,1	124,3
3,4	1,2	2,7	2,3	1,8	118,9	145,9	143,2	118,9
3,0	3,5	2,4	2,7	1,9	159,4	89,2	110,8	91,9
3,8	2,7	2,6	2,6	1,8	170,3	159,4	137,8	78,4
2,2	1,0	1,0	3,7	2,3	73,0	105,4	135,1	91,9
2,5	1,2	1,0	3,0	1,4	100,0	145,9	148,6	67,6
3,0	3,1	1,8	1,8	3,0	127,0	75,7	132,4	105,4

## Média e intervalo de confiança 95%

2,7 (2,3 - 3,1)	2,4 (1,8 - 3,0)	2,6 (1,9 - 3,3)	2,5 (2,0 - 3,0)	2,1 (1,8 - 2,4)	134,9 (110,6-159,1)	137,8 (111,4-164,2)	124,0 (102,2-145,8)	99,2 (78,7-119,6)
--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	------------------------	------------------------	------------------------	----------------------

## Média e erro padrão da média

2,7 ± 0,2	2,4 ± 0,3	2,6 ± 0,4	2,5 ± 0,2	2,1 ± 0,2	134,9 ± 10,7	137,8 ± 11,7	124,0 ± 9,6	99,2 ± 9,0
-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	--------------	--------------	-------------	------------

<sup>1</sup>Ganho de peso corpóreo de camundongos .<sup>2</sup>Preparação de toxina pertussis de referência NIBSC 90/518<sup>3</sup>Ganho de peso em relação ao peso inicial<sup>4</sup>Porcentagem de ganho de peso em relação ao controle PBS<sup>5</sup>Controle-solvente (PBS)

Tabela 5

Ensaio de GPCC<sup>1</sup> da toxina pertussis ( TP)<sup>2</sup> em camundongos NIH e BALB/cAn machos

NIH ganho de peso <sup>3</sup> (g) - 3 <sup>o</sup> dia Doses de TP (µg)/camundongo					NIH % de ganho de peso <sup>4</sup> - 7 <sup>o</sup> dia Doses de TP (µg) /camundongo			
PBS <sup>4</sup>	0,25	0,5	1,0	2,0	0,25	0,5	1,0	2,0
4,9	4,9	4,1	4,5	4,1	104,6	95,3	91,9	69,8
4,4	3,7	5,6	4,2	4,2	86,0	113,9	70,9	83,7
5,5	5,4	4,9	3,6	2,8	118,6	120,9	103,5	65,1
5,8	4,6	5,3	3,0	4,3	107,0	110,5	82,5	55,8
2,7	5,3	3,7	5,4	2,0	123,3	105,8	98,8	72,1
5,7	4,3	4,4	4,5	4,3	98,8	100,0	93,0	102,3
5,8	3,9	4,7	4,6	4,4	131,4	126,7	119,8	93,0
5,1	2,4	3,9	4,3	3,7	98,8	96,5	102,3	95,3
6,0	4,5	4,7	5,9	2,8	108,1	109,3	103,5	73,3
5,0	5,0	4,3	3,1	2,6	128,0	119,8	63,9	77,9

Média e intervalo de confiança 95%

5,1 (4,4-5,8)	4,4 (3,7-5,0)	4,5 (4,1-5,0)	4,3 (3,6-5,0)	3,5 (2,9-4,1)	110,5 (100,1-120,9)	109,9 (102,2-117,5)	93,0 (81,1-104,9)	78,8 (68,4-89,3)
------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------------	------------------------	----------------------	---------------------

Média e erro padrão da média

5,1 ± 0,3	4,4 ± 0,3	4,5 ± 0,2	4,3 ± 0,3	3,5 ± 0,3	110,5 ± 4,6	109,9 ± 3,4	93,0 ± 5,3	78,8 ± 4,6
-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-------------	-------------	------------	------------

BALB/cAn ganho de peso <sup>3</sup> (g) - 3 <sup>o</sup> dia Doses de TP (µg) /camundongo					BALB/cAn % de ganho de peso <sup>4</sup> - 7 <sup>o</sup> dia Doses de TP (µg) /camundongo			
PBS <sup>5</sup>	0,25	0,5	1,0	2,0	0,25	0,5	1,0	2,0
2,6	3,4	1,9	3,6	2,9	73,4	85,9	103,1	82,8
3,3	2,0	3,2	3,8	3,4	79,7	79,7	128,1	101,5
4,1	1,5	3,1	3,4	2,7	31,2	62,5	95,3	78,1
5,0	2,7	3,2	1,7	3,6	90,6	114,1	68,7	104,7
4,3	4,2	4,3	2,6	2,9	114,1	112,5	98,4	67,2
4,0	2,5	2,7	2,4	3,7	60,9	87,5	79,7	95,3
3,8	2,6	2,6	1,4	5,1	106,2	82,8	43,7	112,5
2,7	2,8	4,0	3,2	4,2	100,0	135,9	73,4	75,0
4,1	4,9	3,0	2,7	-0,4	107,8	100,0	56,2	39,1
3,8	3,2	2,3	3,9	1,8	114,1	79,7	79,7	46,9

Média e intervalo de confiança 95%

3,8 (3,2-4,3)	3,0 (2,3-3,7)	3,0 (2,5-3,5)	2,9 (2,2-3,5)	3,0 (1,9-4,0)	87,8 (68,6-107,0)	94,1 (78,7-109,5)	82,6 (65,1-100,2)	80,3 (62,9-97,7)
------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	----------------------	----------------------	----------------------	---------------------

Média e erro padrão da média

3,8 ± 0,2	3,0 ± 0,3	3,0 ± 0,2	2,9 ± 0,3	3,0 ± 0,5	87,8 ± 8,5	94,1 ± 6,8	82,6 ± 7,7	80,3 ± 7,7
-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	------------	------------	------------	------------

<sup>1</sup>Ganho de peso corpóreo de camundongos<sup>2</sup>Preparação de toxina pertussis de referência NIBSC 90/518<sup>3</sup>Ganho de peso em relação ao peso inicial<sup>4</sup>Porcentagem de ganho de peso em relação ao controle PBS<sup>5</sup>Controle-solvente (PBS)

#### 4.2.2 Avaliação do ganho de peso dos camundongos dos grupos controles PBS fêmeas e machos de ambas as linhagens.

Os dados da Tabela 6 seguiram uma distribuição normal para ambas as linhagens e sexos ( $p > 0,1$ ).

Tabela 6

Ganho de peso <sup>1</sup> de camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas e machos 3 <sup>o</sup> , 7 <sup>o</sup> , 14 <sup>o</sup> e 21 <sup>o</sup> dias após inoculação intraperitoneal com PBS (controle)							
NIH fêmea ganho de peso (g)				BALB/cAn fêmea ganho de peso (g)			
3 <sup>o</sup> dia	7 <sup>o</sup> dia	14 <sup>o</sup> dia	21 <sup>o</sup> dia	3 <sup>o</sup> dia	7 <sup>o</sup> dia	14 <sup>o</sup> dia	21 <sup>o</sup> dia
3,1	7,0	8,3	9,1	2,7	4,4	5,0	8,2
3,7	5,6	7,1	8,8	3,0	4,2	5,2	8,7
3,6	5,2	8,1	9,3	2,2	3,4	4,9	8,2
3,5	5,4	6,2	8,0	1,5	2,9	4,1	8,2
4,6	7,9	8,9	10,9	3,4	4,8	5,7	7,2
2,7	4,7	4,8	5,0	3,0	3,6	4,6	8,3
4,4	9,8	11,9	13,9	3,8	4,1	5,6	9,2
4,2	4,8	5,5	8,1	2,2	2,4	2,7	4,4
3,4	6,0	8,3	10,3	2,5	3,5	5,4	7,7
4,5	9,2	11,2	11,4	3,0	3,8	4,9	6,9
Média e intervalo de confiança 95% (g)							
3,8 (3,3-4,2)	6,6 (5,2-7,9)	8,0 (6,4-9,7)	9,5 (7,8-11,2)	2,7 (2,3-3,2)	3,7 (3,2-4,2)	4,8 (4,2-5,4)	7,7 (6,7-8,7)
Média e erro padrão da média							
3,8 ± 0,2	6,6 ± 0,6	8,0 ± 0,7	9,5 ± 0,8	2,7 ± 0,2	3,7 ± 0,2	4,8 ± 0,3	7,7 ± 0,4
NIH macho ganho de peso <sup>1</sup> (g)				BALB/cAn macho ganho de peso <sup>1</sup> (g)			
3 <sup>o</sup> dia	7 <sup>o</sup> dia	14 <sup>o</sup> dia	21 <sup>o</sup> dia	3 <sup>o</sup> dia	7 <sup>o</sup> dia	14 <sup>o</sup> dia	21 <sup>o</sup> dia
4,9	10,0	10,5	14,7	2,6	3,6	5,5	7,0
4,4	10,0	11,0	12,6	3,3	6,6	7,6	9,3
5,5	8,9	12,1	14,8	4,1	9,4	12,0	13,9
5,8	10,6	8,3	13,5	5,0	9,3	11,8	12,1
2,7	3,9	11,9	16,5	4,3	5,9	8,5	9,2
5,7	8,2	8,8	11,2	4,0	6,2	7,1	8,5
5,8	9,4	12,0	15,4	3,8	6,0	7,4	8,8
5,1	9,8	12,6	16,5	2,7	3,3	8,1	9,1
6,0	7,6	11,7	14,8	4,1	7,3	9,4	11,3
5,0	7,6	9,7	11,3	3,8	6,8	8,3	12,6
Média e intervalo de confiança 95% (g)							
5,1 (4,4-5,8)	8,6 (7,2-10,0)	10,9 (9,8-11,9)	14,1 (12,7-15,5)	3,8 (3,2-4,3)	6,4 (5,0-7,9)	8,6 (7,1-10,0)	10,2 (8,6-11,7)
Média e erro padrão da média							
5,1 ± 1,0	8,6 ± 1,9	10,9 ± 1,5	14,1 ± 1,9	3,8 ± 0,7	6,4 ± 2,0	8,6 ± 2,0	10,2 ± 2,2

<sup>1</sup>Ganho de peso em relação ao peso inicial

O ganho de peso médio dos camundongos controles BALB/cAn fêmeas (Figura 4) e machos (Figura 5) foram significativamente inferiores pelo teste t de *Student* aos da linhagem NIH no 3º ( $p < 0,01$ ); 7º ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ ); 14º ( $P < 0,001$  e  $p < 0,01$ ) e 21º ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ ) dias após inoculação com PBS .

Figura 4 - Efeito do controle PBS no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas 3º, 7º, 14º e 21º dias após inoculação intraperitoneal. Barras indicam erro padrão da média (EPM) do ganho de peso médio de 10 animais. \*indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ), \*\* indica diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ ) e \*\*\*indica diferença extremamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre as duas linhagens pelo teste t de *Student*.

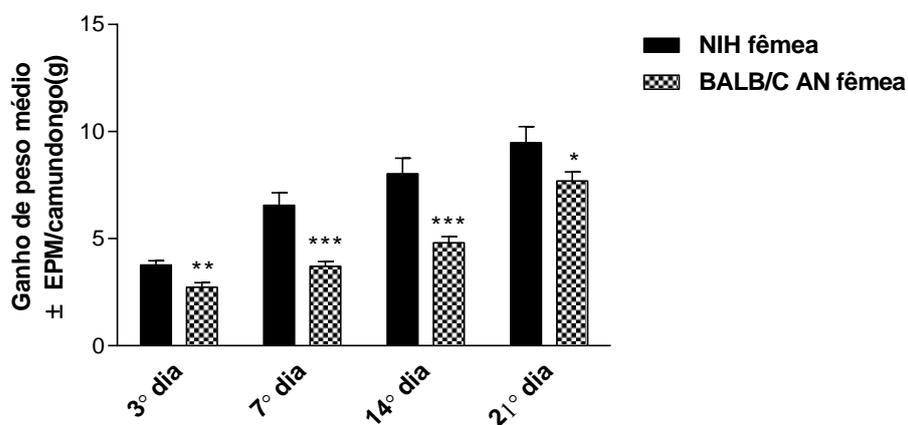
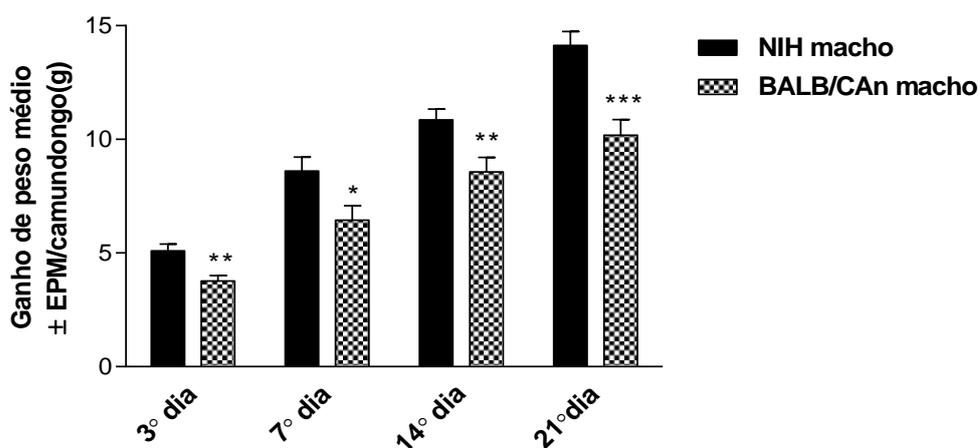


Figura 5 - Efeito do controle PBS no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn machos 3º, 7º, 14º e 21º dias após inoculação intraperitoneal. Barras indicam erro padrão da média (EPM) do ganho de peso médio de 10 animais. \*indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ), \*\* indica diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ ) e \*\*\*indica diferença extremamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre as duas linhagens pelo teste t de *Student*.



#### 4.2.3 Efeito da Toxina Pertussis (TP) no ganho de peso dos animais

Com a finalidade de se avaliar a sensibilidade entre os camundongos das linhagens NIH e BALB/cAn fêmeas e machos para detecção de TP, acompanhamos o comportamento de ganho de peso dos animais inoculados com quatro doses de TP (0,25; 0,5; 1,0 e 2,0  $\mu\text{g}/\text{camundongo}$ ), e do grupo controle PBS durante 3 e 7 dias e por períodos superiores a 7 dias, ou seja, por 14 e 21 dias.

Os dados das Tabelas 4 e 5 seguiram uma distribuição normal para ambas as linhagens ( $p>0,1$ ) e as variâncias não foram significativamente diferentes ( $p>0,1$ ) para as fêmeas NIH, BALB/cAn e para os machos NIH e no BALB/cAn ( $p>0,05$ ).

As Figuras 6 e 7 mostram os valores médios e erros padrões das médias de ganhos de pesos de camundongos das linhagens NIH e BALB/cAn fêmeas e machos no 3º dia em relação ao peso inicial para as doses de TP e para o grupo controle PBS.

A partir da ANOVA, o tratamento com a TP, nas doses de 0,25 a 2,0  $\mu\text{g}/\text{camundongo}$  nas linhagens NIH e BALB/cAn fêmeas (Figura 6), três dias após a inoculação, não interferiu no ganho de peso médio em relação ao peso inicial ( $p>0,05$  e  $p>0,1$ , respectivamente), quando comparado ao ganho de peso médio do grupo controle PBS. O mesmo resultado ocorreu para os machos (Figura 7) NIH ( $p>0,1$ ) e BALB/cAn ( $p>0,1$ ).

Figura 6 - Efeito da toxina pertussis (TP) no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas 3 dias após a inoculação intraperitoneal. Barras indicam o erro padrão média (EPM) do ganho de peso médio de 10 animais.

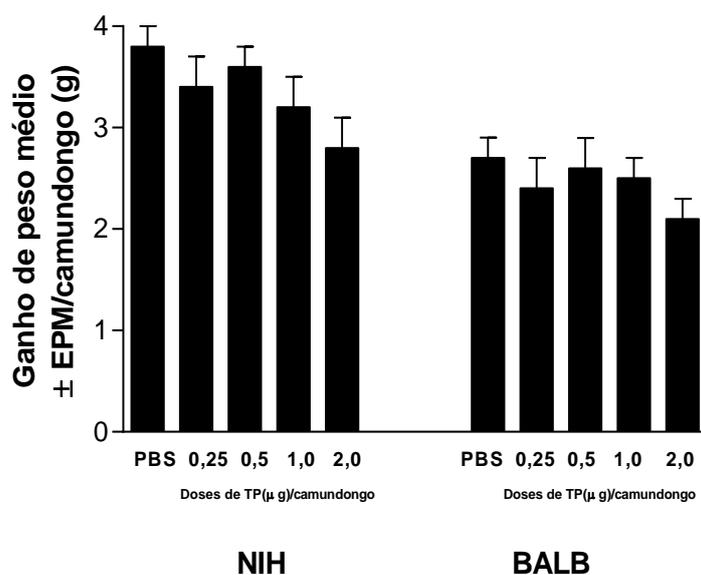
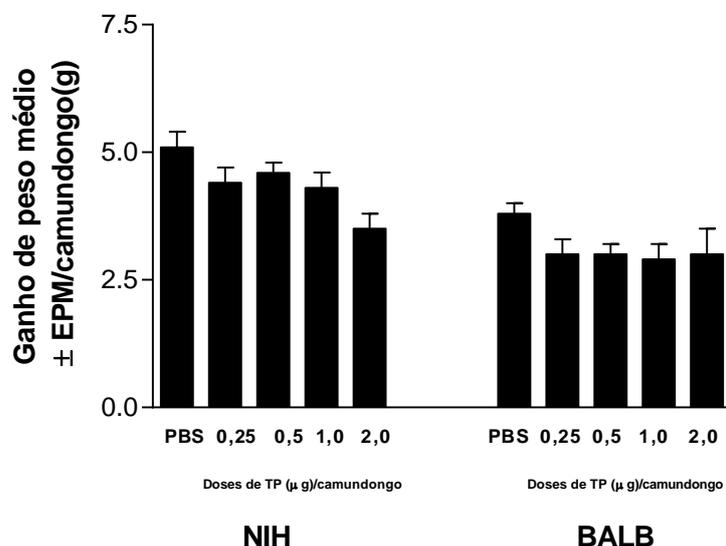


Figura 7 - Efeito da toxina pertussis (TP) no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn machos 3 dias após a inoculação intraperitoneal. Barras indicam o erro padrão da média (EPM) do ganho de peso médio de 10 animais.



As Figuras 8 e 9 mostram os valores médios e erros padrões das médias dos percentuais de ganho de peso de camundongos das linhagens NIH e BALB/cAn fêmeas e machos no 7º dia em relação ao controle (PBS) para as quatro doses de TP.

Quanto à percentagem de ganho de peso no 7º dia em relação ao controle (PBS) o tratamento com a TP, nas doses de 0,25 a 2,0 µg/camundongo em fêmeas e machos das linhagens NIH e BALB/cAn, mostram dados que seguiram uma distribuição normal para ambas as linhagens ( $p > 0,1$ ) com variâncias que não foram significativamente diferentes ( $p > 0,1$ ).

Através da ANOVA não houve diferença significativa no percentual de ganho de peso médio sete dias após a inoculação de doses de TP de 0,25 a 2,0 µg /camundongo em relação ao controle (PBS) em fêmeas NIH ( $p > 0,1$ ) e BALB/cAn ( $p = 0,05$ ) como mostrado na Figura 8. Para os machos da linhagem NIH Figura 9, o percentual de ganho de peso na dose de 2 µg foi significativamente inferior às doses de 0,25 e 0,5 µg ( $p < 0,001$ ) e à dose de 1 µg ( $p < 0,05$ ). Para os machos da linhagem BALB/cAn não se detectou diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

Figura 8 - Efeito da toxina pertussis (TP) na percentagem de ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas em relação ao controle sete dias após a inoculação intraperitoneal. Barras indicam o erro padrão da média (EPM) do percentual de ganho de peso médio de 10 animais.

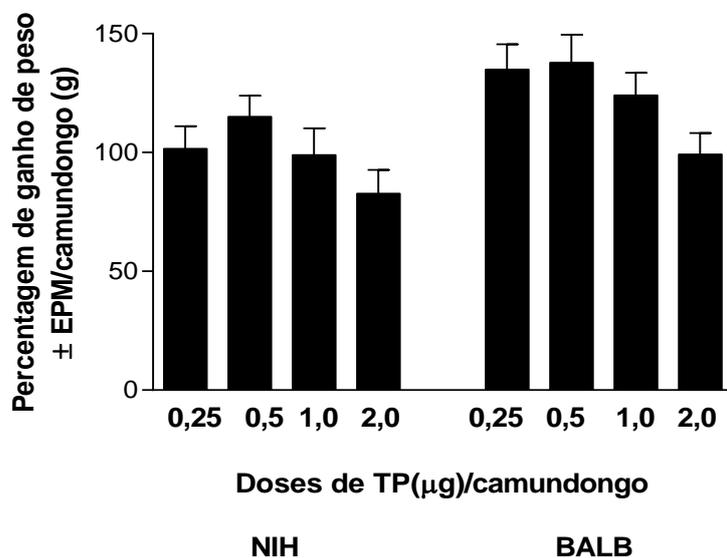
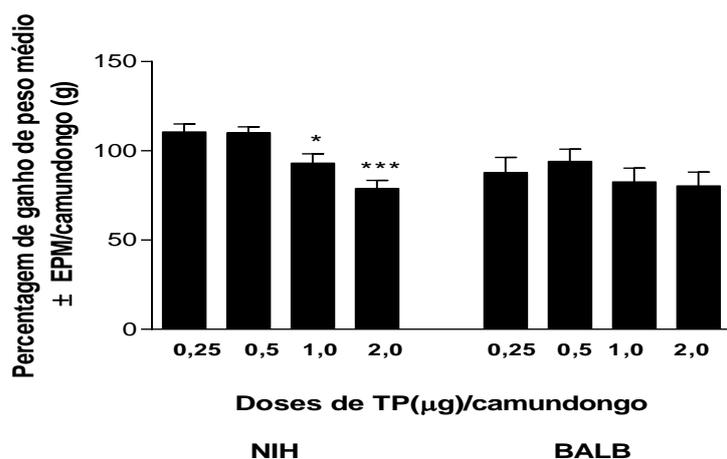


Figura 9 - Efeito da toxina pertussis (TP) na percentagem de ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn machos em relação ao controle sete dias após a inoculação intraperitoneal. Barras indicam o erro padrão da média (EPM) do percentual de ganho de peso médio de 10 animais \*indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e \*\*\*indica diferença extremamente significativa ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle PBS pela ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey.



Após o 7º dia (Tabela 7) e o 14º dia (Tabela 8) da inoculação intraperitoneal com PBS e a TP nas doses de 0,25 a 2,0 µg/camundongo em fêmeas e machos das linhagens NIH e BALB/cAn, os dados de ganho de peso seguiram uma distribuição normal e as variâncias não foram significativamente diferentes ( $p > 0,1$ ).

Tabela 7

Efeito da toxina pertussis (TP)<sup>1</sup> em camundongos fêmeas e machos das linhagens NIH e BALB/cAn 7 dias após inoculação intraperitoneal

NIH fêmea ganho de peso <sup>2</sup> (g) - 7 <sup>o</sup> dia Doses de TP (µg) /camundongo					BALB/cAn fêmea ganho de peso <sup>2</sup> (g) - 7 <sup>o</sup> dia Doses de TP (µg) /camundongo				
PBS <sup>3</sup>	0,25	0,5	1,0	2,0	PBS <sup>3</sup>	0,25	0,5	1,0	2,0
7,0	2,9	7,2	9,2	7,2	4,4	6,2	6,0	1,7	5,4
5,6	5,1	8,2	6,6	5,5	4,2	4,6	5,4	5,3	4,3
5,2	7,3	8,3	6,0	3,1	3,4	6,6	5,6	5,0	1,9
5,4	6,8	7,7	8,4	3,6	2,9	4,8	7,3	4,0	4,6
7,9	7,6	5,3	7,8	5,0	4,8	4,4	5,4	5,3	4,4
4,7	8,8	5,1	4,3	7,3	3,6	5,9	3,3	4,1	3,4
9,8	7,0	10,2	10,0	8,1	4,1	6,3	5,9	5,1	2,9
4,8	9,1	10,6	6,3	1,7	2,4	2,7	3,9	5,0	3,4
6,0	4,4	7,3	3,0	6,6	3,5	3,7	5,4	5,5	2,5
9,2	8,0	6,1	3,7	6,5	3,8	4,7	2,8	4,9	3,9

Média e intervalo de confiança 95% (g)

6,6 (5,2-7,9) 6,7 (5,3-8,1) 7,6 (6,3-8,9) 6,5 (4,8-8,2) 5,5 (4,0-7,0) 3,7 (3,2-4,2) 5,0 (4,1-5,9) 5,1 (4,1-6,1) 4,6 (3,8-5,4) 3,7 (2,9-4,4)

Média e erro padrão da média (g)

6,6 ± 0,6 6,7 ± 0,6 7,6 ± 0,6 6,5 ± 0,7 5,5 ± 0,7 3,7 ± 0,2 5,0 ± 0,4 5,1 ± 0,4 4,6 ± 0,4 3,7 ± 0,3

<sup>1</sup>Preparação TP NIBSC 90/518

<sup>2</sup>Ganho de peso em relação ao peso inicial

<sup>3</sup>Controle-solvente (PBS)

NIH macho ganho de peso <sup>2</sup> (g) - 7 <sup>o</sup> dia Doses de TP (µg) /camundongo					BALB/cAn macho ganho de peso <sup>2</sup> (g) - 7 <sup>o</sup> dia Doses de TP (µg) /camundongo				
PBS <sup>3</sup>	0,25	0,5	1,0	2,0	PBS <sup>3</sup>	0,25	0,5	1,0	2,0
10,0	9,0	8,2	7,9	6,0	3,6	4,7	5,5	6,6	5,3
10,0	7,4	9,8	6,1	7,2	6,6	5,1	5,1	8,2	6,5
8,9	10,2	10,4	8,9	5,6	9,4	2,0	4,0	6,1	5,0
10,6	9,2	9,5	7,1	4,8	9,3	5,8	7,3	4,4	6,7
3,9	10,6	9,1	8,5	6,2	5,9	7,3	7,2	6,3	4,3
8,2	8,5	8,6	8,0	8,8	6,2	3,9	5,6	5,1	6,1
9,4	11,3	10,9	10,3	8,0	6,0	6,8	5,3	2,8	7,2
9,8	8,5	8,3	8,8	8,2	3,3	6,4	8,7	4,7	4,8
7,6	9,3	9,4	8,9	6,3	7,3	6,9	6,4	3,6	2,5
7,6	11,0	10,3	5,5	6,7	6,8	7,3	5,1	5,1	3,0

Média e intervalo de confiança 95% (g)

8,6 (7,2-10,0) 9,5 (8,6-10,4) 9,4 (8,8-10,1) 8,0 (7,0-9,0) 6,8 (5,9-7,7) 6,4 (5,0-7,9) 5,6 (4,4-6,8) 6,0 (5,0-7,0) 5,3 (4,1-6,4) 5,1 (4,0-6,2)

Média e erro padrão da média (g)

8,6 ± 0,6 9,5 ± 0,4 9,4 ± 0,3 8,0 ± 0,4 6,8 ± 0,4 6,4 ± 0,6 5,6 ± 0,5 6,0 ± 0,4 5,3 ± 0,5 5,1 ± 0,5

<sup>1</sup>Preparação TP NIBSC 90/518

<sup>2</sup>Ganho de peso em relação ao peso inicial

<sup>3</sup>Controle-solvente (PBS)

Tabela 8

Efeito da toxina pertussis (TP)<sup>1</sup> em camundongos fêmeas e machos NIH e BALB/cAn 14 dias após inoculação intraperitoneal

NIH fêmea ganho de peso <sup>2</sup> (g) - 14 <sup>o</sup> dia Doses de TP (µg) /camundongo					BALB/cAn fêmea ganho de peso <sup>2</sup> (g) - 14 <sup>o</sup> dia Doses de TP (µg) /camundongo				
PBS <sup>3</sup>	0,25	0,5	1,0	2,0	PBS <sup>3</sup>	0,25	0,5	1,0	2,0
8,3	4,9	9,0	11,4	9,4	5,0	7,9	7,4	3,7	8,1
7,1	5,4	3,6	11,5	7,4	5,2	7,0	7,3	7,3	6,4
8,1	8,7	8,7	8,2	4,1	4,9	8,4	8,0	7,1	2,9
6,2	7,9	9,4	7,9	7,8	4,1	8,2	9,4	5,6	6,5
8,9	8,9	8,2	11,1	7,2	5,7	7,3	7,0	8,0	8,1
4,8	10,0	5,7	7,4	12,6	4,6	7,2	4,3	5,5	6,2
11,9	8,4	10,9	8,2	10,7	5,6	9,4	9,8	6,0	4,5
5,5	10,5	7,0	7,4	3,8	2,7	4,0	6,2	7,9	5,6
8,3	5,5	4,6	5,2	7,0	5,4	8,0	8,6	7,6	4,3
11,2	9,1	8,6	7,7	8,5	4,9	5,5	3,9	8,0	5,7
Média e intervalo de confiança 95% (g)									
8,0	7,9	7,6	8,6	7,9	4,8	7,3	7,2	6,7	5,8
(6,4-9,7)	(6,5-9,3)	(5,9-9,2)	(7,1-10,1)	(5,9-9,8)	(4,1- 5,4)	(6,2-8,4)	(5,8-8,6)	(5,7-7,7)	(4,7-7,0)
Média e erro padrão da média (g)									
8,0 ± 0,7	7,9 ± 0,6	7,6 ± 0,7	8,6 ± 0,7	7,9 ± 0,9	4,8 ± 0,3	7,3 ± 0,5	7,2 ± 0,6	6,7 ± 0,5	5,8 ± 0,5

<sup>1</sup>Preparação de TP NIBSC 90/518

<sup>2</sup>Ganho de peso em relação ao peso inicial

<sup>3</sup>Controle-solvente (PBS)

NIH macho ganho de peso <sup>2</sup> (g) - 14 <sup>o</sup> dia Doses de TP (µg) /camundongo					BALB/cAn macho ganho de peso <sup>2</sup> (g) - 14 <sup>o</sup> dia Doses de TP (µg) /camundongo				
PBS <sup>3</sup>	0,25	0,5	1,0	2,0	PBS <sup>3</sup>	0,25	0,5	1,0	2,0
10,5	11,4	13,1	11,1	14,0	5,5	4,7	8,3	8,6	5,9
11,0	15,0	13,5	10,3	13,1	7,6	5,1	7,2	12,5	7,1
12,1	18,1	11,3	15,0	10,6	12,0	2,0	6,6	11,6	6,3
8,3	13,8	11,9	11,0	15,5	11,8	5,8	8,5	7,8	12,8
11,9	15,0	17,1	10,7	7,4	8,5	7,3	8,7	7,2	6,6
8,8	11,8	13,8	10,8	11,5	7,1	3,9	8,7	10,7	8,0
12,0	12,3	15,3	13,7	12,0	7,4	6,8	8,4	8,4	8,6
12,6	13,6	10,9	13,1	13,2	8,1	6,4	8,5	3,5	8,0
11,7	12,0	12,4	12,2	9,2	9,4	6,9	6,4	8,1	3,4
9,7	13,4	15,9	10,3	11,2	8,3	7,3	9,1	8,7	7,5
Média e intervalo de confiança 95% (g)									
10,9	13,6	13,5	11,8	11,8	8,6	5,6	8,0	8,7	7,4
(9,8-11,9)	(12,2-15,1)	(12,1-15,0)	(10,7-13,0)	(10,1-13,5)	(7,1-10,0)	(4,4-6,8)	(7,3-8,7)	(6,9-10,5)	(5,7-9,1)
Média e erro padrão da média (g)									
10,9 ± 0,5	13,6 ± 0,6	13,5 ± 0,6	11,8 ± 0,5	11,8 ± 0,5	8,6 ± 0,6	5,6 ± 0,5	8,0 ± 0,3	8,7 ± 0,8	7,4 ± 0,7

<sup>1</sup>Preparação de toxina pertussis de referência TPR NIBSC 90/518

<sup>2</sup>Controle-solvente (PBS)

<sup>3</sup>Ganho de peso em relação ao peso inicial

Não foram detectadas pela ANOVA diferenças significativas ( $p > 0,1$ ) no ganho de peso médio nas doses 0,25 a 2,0  $\mu\text{g}/\text{camundongo}$  na linhagem NIH fêmea no 7º dia (Figura 10) e 14º dia (Figura 11) em relação ao controle (PBS). Entretanto, para a linhagem BALB/cAn fêmea no 7º dia (Figura 10) e no 14º dia (Figura 11) o ganho de peso médio dos animais nas doses de 0,25 e 0,5  $\mu\text{g}$  foi superior ao PBS pelos testes de *Dunnnett* ( $p < 0,05$ ) e de *Tukey* ( $< 0,01$ ), respectivamente.

Figura 10 - Efeito da toxina pertussis (TP) no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas 7º dias após a inoculação intraperitoneal. Barras indicam o erro padrão da média (EPM) do ganho de peso médio de 10 animais. \*indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle (PBS) pela ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de *Dunnnett*.

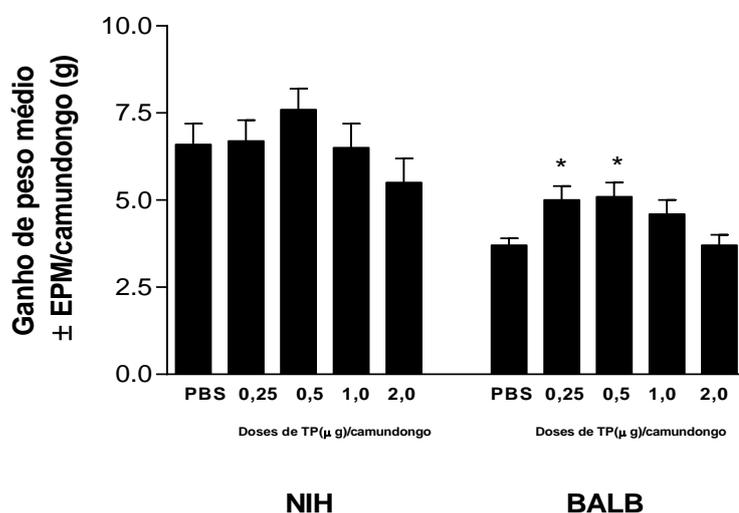
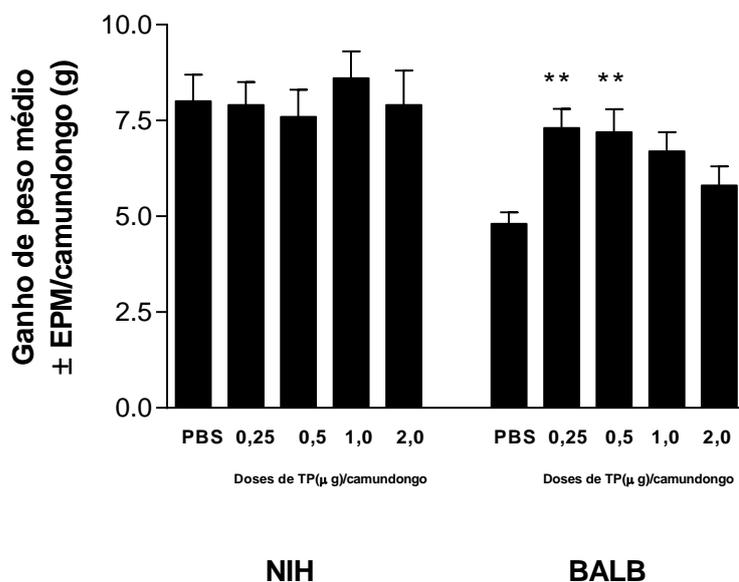


Figura 11 - Efeito da toxina pertussis (TP) no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas 14º dias após a inoculação intraperitoneal. Barras indicam o erro padrão da média (EPM) do ganho de peso médio de 10 animais. \*\*indica diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ ) em relação ao controle (PBS) pela ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de *Tukey*.



Através da ANOVA o ganho de peso médio dos animais NIH machos no 7º dia (Figura 12), na dose de 2,0 µg de TP foi inferior ao do controle ( $p < 0,05$ ) e às doses de 0,25 e 0,5 µg ( $p < 0,001$ ) e no 14º dia (Figura 13), os animais recuperaram peso na dose de 2µg de TP/camundongo igualando-se ao controle e nas doses de 0,25 e 0,5µg de TP os animais mostraram ganho de peso médio superior ao controle ( $p < 0,01$ ).

Em camundongos BALB/cAn machos a TP no 7º dia (Figura 12) não causou alteração no ganho de peso médio em relação ao controle PBS ( $p > 0,1$ ), porém no 14º dia (Figura 13) somente na dose 0,25 µg houve perda de peso dos animais em relação ao controle e à dose de 1,0 µg de TP ( $p < 0,05$ ).

Figura 12 - Efeito da toxina pertussis (TP) no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn machos no 7º dia após inoculação intraperitoneal. Barras indicam o erro padrão da média (EPM) do ganho de peso médio de 10 animais. \*indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle (PBS) e \*\*\* indica diferença extremamente significativa ( $p < 0,001$ ) em relação a dose de 2 µg/camundongo pela Anova seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey

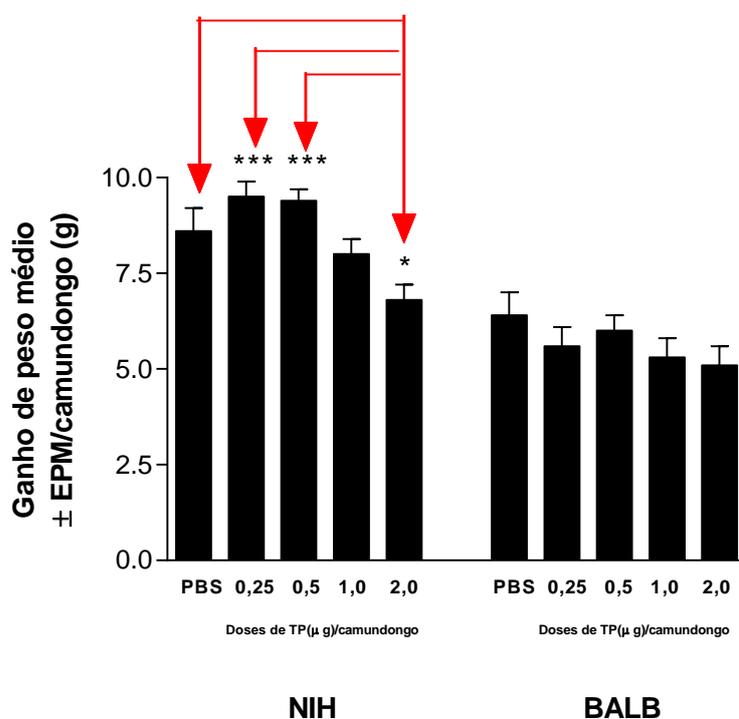
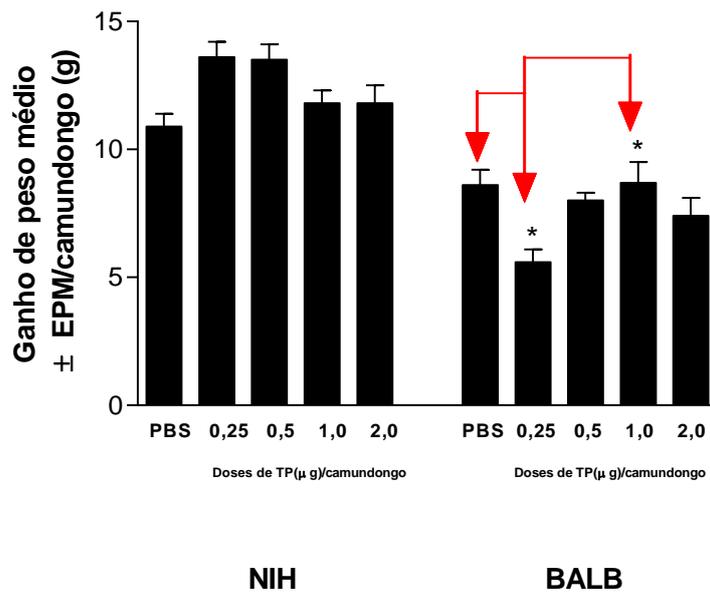


Figura 13 - Efeito da toxina pertussis (TP) no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn machos no 14º dia após a inoculação intraperitoneal. Barras indicam o erro padrão da média (EPM) do ganho de peso médio de 10 animais. \*indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle (PBS) e à dose de 1µg/camundongo pela *Anova* seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey.



No 21º dia, os dados referentes ao ganho de peso dos animais de ambas linhagens e sexos nos grupos controle e inoculados com a TP (Tabela 9) seguiram uma distribuição normal ( $p>0,1$ ) e mostraram variâncias homogêneas ( $p>0,1$ ).

Tabela 9

Efeito da toxina pertussis (TP)<sup>1</sup> em camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas e machos 21 dias após inoculação intraperitoneal

NIH fêmea ganho de peso <sup>2</sup> (g) - 21ºdia Doses de TP (µg) /camundongo					BALB/cAn fêmea ganho de peso <sup>2</sup> (g) - 21ºdia Doses de TP (µg) /camundongo				
PBS <sup>3</sup>	0,25	0,5	1,0	2,0	PBS <sup>3</sup>	0,25	0,5	1,0	2,0
9,1	7,1	10,0	12,5	11,0	8,2	9,0	8,9	4,5	9,4
8,8	5,6	10,4	12,8	8,7	8,7	9,4	8,2	8,0	7,9
9,3	9,2	6,8	10,1	9,2	8,2	12,8	8,4	7,6	4,6
8,0	9,0	8,9	7,9	10,3	8,2	9,0	10,5	6,0	7,1
10,9	10,0	8,3	11,1	10,4	7,2	9,3	7,8	8,2	8,6
5,0	11,7	8,3	8,3	15,2	8,3	8,6	8,1	7,0	8,1
13,9	8,9	12,7	9,2	8,9	9,2	10,0	10,5	7,6	7,4
8,1	10,6	7,8	9,3	5,9	4,4	4,5	8,6	8,7	7,9
10,3	9,0	4,7	7,2	9,3	7,7	9,0	10,0	8,7	6,3
11,4	9,4	9,4	9,4	11,0	6,9	7,1	6,0	9,4	6,2
Média e intervalo de confiança 95% (g)									
9,5 (7,8-10,2)	9,0 (7,8-10,3)	8,7 (7,2-10,3)	9,8 (8,4-11,1)	10,0 (8,3-11,7)	7,7 (6,7- 8,7)	8,9 (7,4-10,4)	8,7 (7,7-9,7)	7,6 (6,5-8,6)	7,4 (6,4-8,3)
Média e erro padrão da média (g)									
9,5 ± 0,8	9,0 ± 0,5	8,7 ± 0,7	9,8 ± 0,6	10,0 ± 0,7	7,7 ± 0,4	8,9 ± 0,7	8,7 ± 0,4	7,6 ± 0,5	7,4 ± 0,4
NIH macho ganho de peso <sup>2</sup> (g) - 21ºdia Doses de TP (µg) /camundongo					BALB/cAn macho ganho de peso <sup>2</sup> (g) - 21ºdia Doses de TP (µg) /camundongo				
PBS <sup>3</sup>	0,25	0,5	1,0	2,0	PBS <sup>3</sup>	0,25	0,5	1,0	2,0
14,7	12,8	16,5	13,4	17,6	7,0	7,8	9,4	10,1	9,0
12,6	19,1	16,5	13,7	15,7	9,3	11,4	9,2	13,5	9,9
14,8	22,0	13,0	19,0	13,7	13,9	9,5	8,0	10,4	9,0
13,5	16,5	14,5	12,9	19,2	12,1	10,3	12,6	8,7	9,7
16,5	17,1	18,6	14,7	13,4	9,2	11,1	10,1	7,6	6,8
11,2	14,5	16,5	12,8	13,1	8,5	4,6	10,4	13,4	9,4
15,4	17,2	17,9	17,1	14,3	8,8	13,1	12,6	9,8	9,7
16,5	17,8	12,7	15,4	17,0	9,1	13,1	10,3	6,5	9,0
14,8	15,4	14,4	14,8	12,4	11,3	11,8	9,1	9,5	3,6
11,3	15,8	18,8	13,5	15,4	12,6	11,5	11,0	9,8	10,5
Média e intervalo de confiança 95% (g)									
14,1 (12,7-15,5)	16,8 (15,0-18,6)	15,9 (14,4-17,5)	14,7 (13,3-16,2)	15,2 (13,6-16,8)	10,2 (8,6-11,7)	10,4 (8,6-12,3)	10,3 (9,2-11,3)	9,9 (8,3-11,5)	8,7 (7,2-10,1)
Média e erro padrão da média (g)									
14,1 ± 0,6	16,8 ± 0,8	15,9 ± 0,7	14,7 ± 0,6	15,2 ± 0,7	10,2 ± 0,7	10,4 ± 0,8	10,3 ± 0,5	9,9 ± 0,7	8,7 ± 0,6

<sup>1</sup>Preparação de toxina pertussis de referência TPR NIBSC 90/518

<sup>2</sup>Ganho de peso em relação ao peso inicial

<sup>3</sup>Controle-solvente (PBS)

Após vinte e um dias não foi detectada pela ANOVA alterações significativas no ganho de peso médio dos animais NIH e BALB/cAn fêmeas ( $p>0,1$  e  $p>0,05$ ) e NIH e BALB/cAn machos, ( $p>0,05$  e  $p>0,1$ ) em relação ao controle, conforme Figuras 14 e 15 .

Figura 14 - Efeito da toxina pertussis (TP) no ganho de peso de camundongos NIH e BALB/cAn fêmeas no 21º dia após a inoculação intraperitoneal. Barras indicam o erro padrão da média (EPM) do ganho de peso médio de 10 animais.

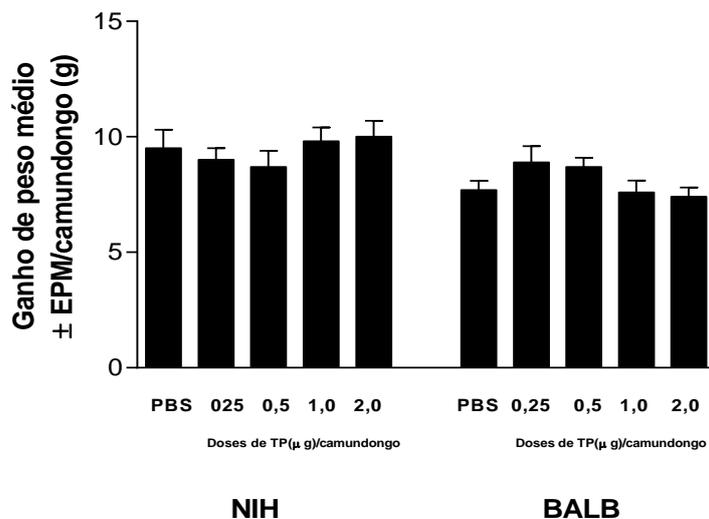
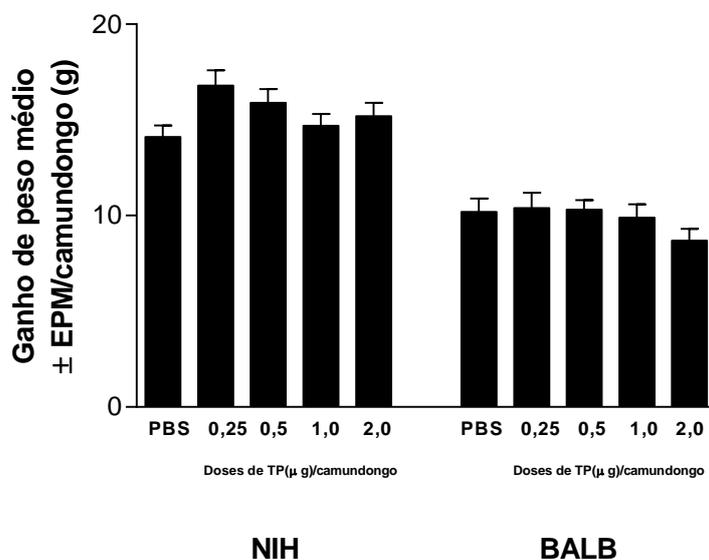


Figura 15 - Efeito da toxina pertussis (TP) no ganho de peso de camundongos NIH BALB/cAn machos no 21º dia após a inoculação intraperitoneal. Barras indicam o erro padrão da média (EPM) do ganho de peso médio de 10 animais.



### 4.3. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TP NOS RESULTADOS DO ENSAIO DE GPCC DA VACINA PERTUSSIS

Independentemente da linhagem e sexo, a TP, na faixa de doses testada de 0,25 a 2,0 µg/camundongo, não causou alteração do ganho de peso corpóreo 3 dias após inoculação intraperitoneal quando comparado aos animais controle inoculados com PBS.

O resultado satisfatório da vacina pertussis no ensaio de GPCC em camundongos NIH fêmeas com a ausência de alteração de ganho de peso corpóreo quando comparada ao controle, 3 e 7 dias após inoculação intraperitoneal da mesma está associada a ausência de efeito da TP na faixa de doses testada de 0,25 a 2 µg/camundongo no mesmo período. A ausência de alteração de peso pela TP em NIH fêmeas foi também constatada após períodos superiores ao do ensaio de GPCC, ou seja após 14 e 21 dias.

A vacina pertussis foi satisfatória no ensaio de GPCC em camundongos BALB/cAn fêmeas apesar da vacina ter causado redução de ganho de peso altamente significativa no 3º dia após inoculação quando comparada aos animais controles (PBS), porém não foi suficiente para reprová-la. A redução de ganho de peso não pode ser atribuída à TP, pois, a TP (0,25 a µg/camundongo) não alterou o ganho de peso em relação ao controle no 3º dia após inoculação. Após 7 dias, a vacina em BALB/cAn fêmeas não alterou o ganho de peso em relação ao controle. O aumento de ganho de peso em relação ao controle causado pelas doses de 0,25 e 0,5 µg de TP/camundongo no 7º e 14º dias não foi considerado biologicamente relevante por não ter sido dose-dependente, pois nas doses superiores de 1 e 2 µg de TP, os ganhos de peso foram não foram significativamente diferentes do controle. No 21º dia, os ganhos de peso dos animais tratados e controle se igualaram.

No ensaio de GPCC da vacina pertussis em machos de ambas as linhagens, a redução de ganho de peso no 3º dia, apesar de extremamente significativa em relação ao controle, não foi suficiente para reprovar a vacina e não pode ser atribuída à TP. Porém no 7º dia, a redução do ganho de peso em relação ao controle em BALB/cAn macho foi mais acentuada do que em NIH macho, levando a

reprovação da vacina pelo % de ganho de peso médio abaixo de 60%, enquanto em NIH macho a vacina seria aprovada considerando-se o critério vigente sendo somente reprovada ao se considerar como critério de reprovação o limite inferior do intervalo de confiança inferior a 60%. Em machos BALB/cAn, se detectou efeito somente na dose de 0,25 µg de TP na redução de ganho de peso em relação ao PBS ( $p < 0,05$ ) no 14º dia, que se igualou ao controle no 21º dia.

Somente na linhagem NIH macho, foi evidente o efeito da dose de 2 µg de TP no 7º dia após sua inoculação, que reduziu significativamente ( $p < 0,001$ ) a percentagem do ganho de peso dos animais em relação a percentagem do ganho de peso dos animais nas menores doses de TP (0,25 e 0,5 µg) e de maneira menos acentuada ( $p < 0,05$ ) em relação à dose de 1 µg. Demonstrou-se, pois, uma relação dose-efeito de redução de percentagem de ganho de peso corpóreo causada pela TP na faixa de 0,25 a 2 µg /camundongo em NIH machos. Quando comparada aos animais controle, verificou-se que somente a dose de 2 µg de TP causou uma redução de ganho de peso médio ( $p < 0,05$ ) em NIH machos 7 dias após sua inoculação e que as duas menores doses de TP mostraram uma diferença extremamente significativa ( $p < 0,001$ ) de ganho de peso em relação à dose de 2 µg, indicando a existência de uma relação dose-resposta. No 14º dia, os animais na dose de 2 µg recuperaram peso, igualando-se ao controle e o ganho de peso nas doses de 0,25 e 0,5 µg foi superior ao do controle. No 21º dia, os ganhos de peso de animais tratados pela TP se igualaram ao controle.

#### 4.4 ENSAIO DE GPCC DA VACINA DTP

Como mostram as Tabelas 10, 11 e 12, os ensaios de GPCC das vacinas DTP realizados em camundongos de ambos sexos linhagem NIH e em fêmeas BALB/cAn apresentaram resultados satisfatórios nas 36 amostras analisadas, ou seja, o ganho de peso médio no 3º dia foi superior ao inicial, no 7º dia, o valor médio e o limite inferior (critério proposto) do intervalo de confiança ( $p=0,05$ ) para o percentual de ganho de peso dos camundongos em relação ao controle foi superior 60% e não houve ocorrência de mortes.

Tabela 10

Resultados do ensaio de GPCC <sup>1</sup> com as vacinas DTP <sup>2</sup> utilizando camundongos fêmeas da linhagem NIH					
Critérios de aprovação <sup>3</sup>					
Amostras de Vacinas DTP	Peso 3º dia > peso inicial	Peso 7º dia $\geq$ 60% do peso do controle	Ausência de mortes	X e IC <sup>4</sup>	X $\pm$ EPM <sup>5</sup>
1	+	+	+	121,1 (99,4-134,5)	121,1 $\pm$ 6,9
2	+	+	+	114,0 (101,4-126,6)	114,0 $\pm$ 6,5
3	+	+	+	86,1 (60,8-111,4)	86,1 $\pm$ 12,9
4	+	+	+	90,5 (72,6-108,4)	90,5 $\pm$ 9,1
5	+	+	+	130,0 (110,6-149,4)	130,0 $\pm$ 9,9
6	+	+	+	117,7 (95,1-140,3)	117,7 $\pm$ 11,5
7	+	+	+	116,3 (90,9-141,7)	116,3 $\pm$ 13,0
8	+	+	+	114,4 (99,3-129,5)	114,4 $\pm$ 7,7
9	+	+	+	129,5 (112,3-146,7)	129,5 $\pm$ 8,8
10	+	+	+	133,9 (120,1-147,7)	133,9 $\pm$ 7,0
11	+	+	+	93,3 (78,8-107,8)	93,3 $\pm$ 7,4
12	+	+	+	111,0 (93,0-129,0)	111,0 $\pm$ 9,2
13	+	+	+	96,2 (93,2-99,2)	96,2 $\pm$ 1,5
14	+	+	+	112,7 (101,6-123,8)	112,7 $\pm$ 5,7
15	+	+	+	111,1 (100,4-121,8)	111,1 $\pm$ 5,4
16	+	+	+	88,2 (68,9-107,5)	88,2 $\pm$ 9,9
17	+	+	+	90,0 (71,3-108,7)	90,0 $\pm$ 9,5
18	+	+	+	105,5 (92,2-118,8)	105,5 $\pm$ 6,8
19	+	+	+	106,3 (97,9-114,7)	106,3 $\pm$ 4,3
20	+	+	+	107,5 (100,6-114,4)	107,5 $\pm$ 3,5
21	+	+	+	103,3 (90,3-116,3)	103,3 $\pm$ 6,8
22	+	+	+	96,3 (85,5-107,1)	96,3 $\pm$ 5,5
23	+	+	+	110,0 (103,5-116,5)	110,0 $\pm$ 3,3
24	+	+	+	112,6 (98,2-127,0)	112,6 $\pm$ 7,3
25	+	+	+	113,1 (103,6-122,6)	113,1 $\pm$ 4,8
26	+	+	+	98,4 (86,4-110,4)	98,4 $\pm$ 6,1
27	+	+	+	110,2 (97,9-122,5)	110,2 $\pm$ 6,3
28	+	+	+	101,8 (83,5-120,1)	101,8 $\pm$ 9,3
29	+	+	+	120,2 (98,0-142,4)	120,2 $\pm$ 11,3
30	+	+	+	99,7 (96,7-102,7)	99,7 $\pm$ 1,5
31	+	+	+	98,7 (83,3-114,1)	98,7 $\pm$ 7,9
32	+	+	+	94,9 (83,2-106,6)	94,9 $\pm$ 6,0
33	+	+	+	105,1 (91,9-118,3)	105,1 $\pm$ 6,7
34	+	+	+	112,9 (103,5-122,3)	112,9 $\pm$ 4,8
35	+	+	+	98,0 (85,0-111,0)	98,0 $\pm$ 6,7
36	+	+	+	88,5 (72,0-105,0)	88,5 $\pm$ 8,4

<sup>1</sup>Ganho de peso corpóreo de camundongos.

<sup>2</sup>Vacina contra a difteria, tétano e coqueluche.

<sup>3</sup>+: Critério atendido.

<sup>4</sup>Valor médio e intervalo de confiança de 95% para percentagens de ganho de peso em relação ao controle no 7º dia.

<sup>5</sup>Valor médio e erro padrão da média para o percentual de ganho de peso em relação ao controle no 7º dia

Tabela 11

Resultados do ensaio de GPCC<sup>1</sup> com as vacinas DTP<sup>2</sup> utilizando camundongos machos da linhagem NIH

Critérios de aprovação <sup>3</sup>						
Amostras de Vacinas DTP	Peso 3º dia > peso inicial	Peso 7º dia ≥ 60% do peso do controle	Ausência de mortes	X e IC <sup>4</sup>	X ± EPM <sup>5</sup>	
1	+	+	+	90,5 (73,6-114,0)	90,5 ± 8,6	
2	+	+	+	102,8 (89,3-116,3)	102,8 ± 6,9	
3	+	+	+	112,9 (102,2-123,6)	112,9 ± 5,5	
4	+	+	+	108,3 (101,9-114,7)	108,3 ± 3,3	
5	+	+	+	104,2 (94,9-113,5)	104,2 ± 4,7	
6	+	+	+	88,4 (84,3-92,5)	88,4 ± 2,1	
7	+	+	+	98,0 (88,1-107,9)	98,0 ± 5,1	
8	+	+	+	107,9 (100,8-115,0)	107,9 ± 3,6	
9	+	+	+	99,8 (93,6-106,0)	99,8 ± 3,2	
10	+	+	+	102,4 (95,8-109,0)	102,4 ± 3,3	
11	+	+	+	95,5 (82,4-103,6)	95,5 ± 4,1	
12	+	+	+	100,3 (95,3-105,3)	100,3 ± 2,2	
13	+	+	+	100,8 (92,2-109,4)	100,8 ± 4,4	
14	+	+	+	103,6 (94,8-112,4)	103,6 ± 4,5	
15	+	+	+	146,9 (139,4-154,4)	146,9 ± 3,8	
16	+	+	+	135,8 (126,3-145,3)	135,8 ± 4,8	
17	+	+	+	147,4 (138,4-156,4)	147,4 ± 4,6	
18	+	+	+	104,3 (98,8-109,8)	104,3 ± 2,8	
19	+	+	+	96,8 (93,2-100,4)	96,8 ± 1,8	
20	+	+	+	105,9 (100,5-111,3)	105,9 ± 2,7	
21	+	+	+	106,1 (98,6-113,6)	106,1 ± 3,8	
22	+	+	+	102,2 (97,1-107,3)	102,2 ± 2,6	
23	+	+	+	141,0 (137,1-144,9)	141,0 ± 2,0	
24	+	+	+	139,2 (135,1-143,3)	139,2 ± 2,1	
25	+	+	+	140,5 (136,5-144,5)	140,5 ± 2,0	
26	+	+	+	139,2 (136,0-142,4)	139,2 ± 1,6	
27	+	+	+	124,2 (116,8-131,6)	124,2 ± 3,8	
28	+	+	+	97,0 (88,8-105,2)	97,0 ± 4,2	
29	+	+	+	85,9 (69,4-102,4)	85,9 ± 8,4	
30	+	+	+	104,5 (96,3-112,7)	104,5 ± 4,2	
31	+	+	+	77,3 (69,3-85,3)	77,3 ± 4,1	
32	+	+	+	91,7 (84,0-99,4)	91,7 ± 3,9	
33	+	+	+	92,6 (85,8-99,4)	92,6 ± 3,5	
34	+	+	+	96,5 (83,4-109,6)	96,5 ± 6,7	
35	+	+	+	93,3 (78,2-108,4)	93,3 ± 7,7	
36	+	+	+	91,0 (82,3-99,7)	91,0 ± 4,5	

<sup>1</sup>Ganho de peso corpóreo de camundongos.

<sup>2</sup>Vacina contra a difteria, tétano e coqueluche.

<sup>3</sup>+: Critério atendido.

<sup>4</sup>Valor médio e intervalo de confiança de 95% para percentagens de ganho de peso em relação ao controle no 7º dia.

<sup>5</sup>Valor médio e erro padrão da média para o percentual de ganho de peso em relação ao controle no 7º dia

Tabela 12

Resultados do ensaio de GPCC<sup>1</sup> com as vacinas DTP<sup>2</sup> utilizando camundongos fêmeas da linhagem BALB/cAn

Amostras de Vacinas DTP	Critérios de aprovação <sup>3</sup>					X e IC <sup>4</sup>	X ± EPM <sup>5</sup>
	Peso 3º dia > peso inicial	Peso 7º dia ≥ 60% do peso do controle	Ausência de mortes				
1	+	+	+		112,6 (97,4-127,8)	112,6 ± 7,8	
2	+	+	+		126,3 (107,8-144,8)	126,3 ± 9,4	
3	+	+	+		117,1 (100,7-133,5)	117,1 ± 8,4	
4	+	+	+		84,0 (68,1-99,9)	84,0 ± 8,1	
5	+	+	+		73,6 (61,3-85,9)	73,6 ± 6,3	
6	+	+	+		101,7 (87,4-116,0)	101,7 ± 7,3	
7	+	+	+		105,0 (90,3-119,7)	105,0 ± 7,5	
8	+	+	+		106,1 (86,0-126,2)	106,1 ± 10,3	
9	+	+	+		101,3 (82,2-120,4)	101,3 ± 9,7	
10	+	+	+		97,3 (86,0-108,6)	97,3 ± 5,8	
11	+	+	+		90,0 (64,3-115,7)	90,0 ± 13,1	
12	+	+	+		85,9 (69,7-102,1)	85,9 ± 8,3	
13	+	+	+		138,8 (126,4-151,2)	138,8 ± 6,3	
14	+	+	+		96,0 (76,5-115,5)	96,0 ± 10,0	
15	+	+	+		146,5 (141,2-151,8)	146,5 ± 2,7	
16	+	+	+		160,6 (151,2-170,0)	160,6 ± 4,8	
17	+	+	+		78,3 (61,4-95,2)	78,3 ± 8,6	
18	+	+	+		97,8 (79,9-115,7)	97,8 ± 9,1	
19	+	+	+		104,1 (96,2-112,0)	104,1 ± 4,0	
20	+	+	+		83,5 (75,6-91,4)	83,5 ± 4,0	
21	+	+	+		96,8 (87,1-106,5)	96,8 ± 5,0	
22	+	+	+		92,9 (83,0-102,8)	92,9 ± 5,0	
23	+	+	+		128,0 (120,5-135,5)	128,0 ± 3,8	
24	+	+	+		86,7 (80,1-93,3)	86,7 ± 3,3	
25	+	+	+		88,6 (82,0-95,2)	88,6 ± 3,3	
26	+	+	+		104,3 (100,3-108,3)	104,3 ± 2,1	
27	+	+	+		84,9 (69,0-100,8)	84,9 ± 8,1	
28	+	+	+		112,1 (103,0-121,2)	112,1 ± 4,6	
29	+	+	+		111,2 (100,4-122,0)	111,2 ± 5,5	
30	+	+	+		116,2 (99,6-132,8)	116,2 ± 8,5	
31	+	+	+		119,7 (110,8-128,6)	119,7 ± 4,6	
32	+	+	+		117,9 (112,3-123,5)	117,9 ± 2,9	
33	+	+	+		81,1 (75,6-86,6)	81,1 ± 2,8	
34	+	+	+		84,3 (77,8-88,3)	84,3 ± 2,1	
35	+	+	+		84,9 (74,7-95,1)	75,9 ± 8,5	
36	+	+	+		77,0 (65,5-88,5)	77,0 ± 5,9	

<sup>1</sup>Ganho de peso corpóreo de camundongos.

<sup>2</sup>Vacina contra a difteria, tétano e coqueluche.

<sup>3</sup>+: Critério atendido.

<sup>4</sup>Valor médio e intervalo de confiança de 95% para percentagens de ganho de peso em relação ao controle no 7º dia.

<sup>5</sup>Valor médio e erro padrão da média para o percentual de ganho de peso em relação ao controle no 7º dia

Diferentemente do resultado satisfatório do ensaio de GPCC de 100% das amostras de vacinas DTP em camundongos NIH de ambos os sexos e em fêmeas BALB/cAn, em machos BALB/cAn, para duas amostras 31 e 32 o ensaio de GPCC foi insatisfatório pelo critério vigente, como mostra a Tabela 13. Como em fêmeas BALB/cAn (Tabela 12), em machos BALB/cAn (Tabela 13), o ganho de peso médio no 3º dia após inoculação das amostras 31 e 32 foi superior ao inicial e não houve ocorrência de mortes, porém, no 7º dia, o percentual de ganho de peso médio foi inferior a 60% do ganho de peso médio do controle.

Como mostra a Tabela 13, de acordo com os 3 critérios vigentes, as amostras 19, 33 e 36, foram satisfatórias no GPCC em machos BALB/cAn. Porém, ao se considerar o critério proposto, as amostras seriam consideradas insatisfatórias no ensaio de GPCC, pois, o valor do limite inferior do intervalo de confiança  $p=0,05$  para o percentual de ganho de peso dos camundongos foi inferior a 60% ao do controle.

Tabela 13

Resultados do ensaio de GPCC <sup>1</sup> com as vacinas DTP <sup>2</sup> utilizando camundongos macho da linhagem BALB/cAn					
Critérios de aprovação <sup>3</sup>					
Amostras de Vacinas DTP	Peso 3º dia > peso inicial	Peso 7º dia ≥ 60% do peso do controle	Ausência de mortes	X e IC <sup>4</sup>	X ± EPM <sup>5</sup>
1	+	+	+	90,5 (80,1-100,9)	90,5 ± 5,3
2	+	+	+	91,8 (81,3-102,3)	91,8 ± 5,3
3	+	+	+	75,6 (65,8-85,4)	75,6 ± 5,0
4	+	+	+	93,4 (86,5-100,3)	93,4 ± 3,5
5	+	+	+	62,6 (55,2-170,0)	62,6 ± 3,8
6	+	+	+	60,6 (142,3-178,9)	60,6 ± 9,3
7	+	+	+	84,8 (80,3-89,3)	84,8 ± 2,3
8	+	+	+	77,0 (72,6-79,6)	77,0 ± 1,4
9	+	+	+	90,7 (85,1-96,3)	90,7 ± 2,8
10	+	+	+	92,9 (90,2-95,6)	92,9 ± 1,4
11	+	+	+	96,7 (93,4-100,0)	96,7 ± 1,7
12	+	+	+	91,7 (88,3-95,1)	91,7 ± 1,7
13	+	+	+	91,5 (88,0-95,0)	91,5 ± 1,8
14	+	+	+	93,5 (90,0-97,0)	93,5 ± 1,8
15	+	+	+	99,5 (95,4-103,6)	99,5 ± 2,1
16	+	+	+	104,1 (100,9-107,3)	104,1 ± 1,6
17	+	+	+	104,3 (98,6-110,0)	104,3 ± 1,8
18	+	+	+	105,2 (100,1-110,3)	105,2 ± 2,6
19	+	+	+	82,8 (55,5-110,1)	82,8 ± 13,9
20	+	+	+	132,0 (102,1-161,9)	132,0 ± 15,3
21	+	+	+	133,5 (99,8-167,2)	133,5 ± 17,2
22	+	+	+	119,3 (89,8-148,8)	119,3 ± 15,1
23	+	+	+	145,5 (131,2-159,8)	145,5 ± 7,3
24	+	+	+	125,0 (104,1-145,9)	125,0 ± 10,7
25	+	+	+	108,8 (103,1-114,5)	108,8 ± 2,9
26	+	+	+	119,5 (107,5-131,5)	119,5 ± 6,1
27	+	+	+	142,0 (138,0-146,0)	142,0 ± 2,0
28	+	+	+	121,5 (113,8-129,2)	121,5 ± 3,9
29	+	+	+	94,8 (82,4-107,2)	94,8 ± 6,3
30	+	+	+	104,0 (96,0-112,0)	104,0 ± 4,1
31	+	-	+	57,0 (42,0 -72,0)	57,0 ± 7,7
32	+	-	+	51,0 (27,7-74,3)	51,0 ± 11,9
33	+	+	+	70,2 (40,7-99,7)	70,2 ± 15,1
34	+	+	+	149,0 (113,9-184,1)	149,0 ± 17,9
35	+	+	+	155,4 (117,6-193,2)	155,4 ± 19,3
36	+	+	+	72,0 (55,1-88,9)	72,0 ± 8,6

<sup>1</sup>Ganho de peso corpóreo de camundongos.

<sup>2</sup>Vacina contra a difteria, tétano e coqueluche.

<sup>3</sup>+: Critério de aprovação atendido; -: Critério de aprovação não atendido.

<sup>4</sup>Valor médio e intervalo de confiança de 95% para percentagens de ganho de peso em relação ao controle no 7º dia.

<sup>5</sup>Valor médio e erro padrão da média para o percentual de ganho de peso em relação ao controle no 7º dia.

Todas as amostras de vacinas DTP em camundongos NIH de ambos os sexos e em fêmeas BALB/cAn foram satisfatórias no ensaio de GPCC pelos critérios vigente e proposto.

No entanto, o ensaio de GPCC em camundongos machos BALB/cAn reprovaria 6% das vacinas DTP pelo critério vigente relativo ao valor médio de percentagem de ganho de peso corpóreo inferior a 60% e 8% seriam reprovadas somente pelo critério proposto no 7º dia de valor do limite inferior de percentagem de ganho de peso abaixo de 60% em relação ao controle. Considerando-se ambos critérios, 14% das amostras seriam reprovadas.

O ensaio de GPCC das vacinas DTP em camundongos machos BALB/cAn reprovariam a vacina pelo mesmo critério como o que ocorreu com a vacina pertussis de referência 66/303 do NIBSC na mesma linhagem e sexo.

Como o resultado insatisfatório da vacina pertussis de referência no ensaio de GPCC em machos BALB/cAn invalida o ensaio de amostras de vacinas DTP, os camundongos machos BALB/cAn mostraram-se inadequados para utilização no ensaio de GPCC. Conseqüentemente, os resultados insatisfatórios obtidos para as vacinas DTP não deveriam ser considerados.

## 5.CONCLUSÕES

- Baseado nos resultados com a vacina pertussis o emprego de fêmeas NIH no GPCC mostrou-se como a melhor opção seguida pelo BALB/cAn fêmea.
- Os camundongos machos de ambas as linhagens mostraram-se inadequados para utilização no ensaio de GPCC da vacina, pois, em BALB/cAn, o resultado foi insatisfatório no critério em vigência e no NIH no critério a ser proposto
- Independentemente da linhagem e sexo, a TP não causou alteração do ganho de peso, 3 dias após a sua inoculação quando comparado aos animais controle (PBS).
- Não se evidenciou em fêmeas NIH alteração de ganho de peso pela TP na faixa de doses de 0,25 a 2 µg /camundongo, 3,7,14 e 21dias após a sua inoculação.
- O efeito da TP em fêmeas BALB/cAn foi, diferentemente dos machos NIH e BALB/cAn, o de aumento de ganho de peso médio dos animais inoculados com 0,25 e 0,5 µg de TP em relação ao grupo controle PBS evidenciado após 7 dias ( $p < 0,05$ ) e 14 dias de forma mais acentuada ( $p < 0,01$ ), porém não foi dose-dependente, pois as maiores doses de 1 e 2 µg não diferiram em relação ao controle. No 21° dia, os ganhos de peso de animais tratados se igualaram ao controle.
- Demonstrou-se, uma relação dose-efeito de redução de % de ganho de peso corpóreo em relação ao controle 7dias após a inoculação intraperitoneal de TP na faixa de 0,25 a 2 µg/camundongo em NIH machos. Somente a dose de 2 µg de TP causou uma significativa redução de ganho de peso médio ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais controle e às menores doses de TP testadas ( $p < 0,001$ ). No 14° dia, os animais na dose de 2 µg recuperaram peso, igualando-se ao controle e o ganho de peso nas doses de 0,25 e 0,5 µg foi superior ao do controle. No 21° dia, os ganhos de peso de animais tratados pela TP se igualaram ao controle.

- Em machos BALB/cAn, no 7º dia, a TP não alterou o ganho de peso médio em relação ao controle, porém, no 14º dia, somente 0,25 µg de TP reduziu o ganho de peso em relação ao PBS, que se igualou ao controle no 21º dia.
- A consideração do valor do limite inferior do intervalo de confiança  $p=0,05$  do ganho de peso médio dos animais 7 dias após inoculação com a vacina como sendo igual ou maior do a 60% tratados no 7º dia igual ou maior que ou superior ao do controle limite inferior do intervalo de confiança para  $p=0,05$  do percentual de ganho de peso no 7º dia em relação ao controle ser igual ou superior a 60%.
- A adoção de novo critério de aprovação de vacina DTP no ensaio de GPCC baseado no valor do limite inferior do intervalo de confiança ( $p=0,05$ ) do ganho de peso médio do grupo tratado como sendo igual ou maior a 60% do ganho de peso dos animais do grupo controle deve ser encorajado por aumentar a sensibilidade do ensaio do GPCC.
- Os resultados insatisfatórios obtidos para as vacinas DTP em camundongos BALB/cAn machos não devem ser considerados, pois a referida linhagem foi considerada imprópria quando testada com a vacina pertussis de referência.

## REFERÊNCIAS

ATKINSON, W; WOLF, C; HUMISTON, S; et al. **Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases**. 6<sup>th</sup> Edition – Department of Health and Human Services. CDC-USA, January 2000. 67-83p.

BARKIN, R.M.; SAMUELSON J.S. and GOLTIN L.P. DTP Reactions and Serologic Response with a Reduced Dose Schedule, **J.Pediatr.** 1984. 105,189-194p.

BELCHER, C; DRENKOW,J; KEHOE,B; et al. **The transcriptional responses of respiratory epithelial cells to *Bordetella pertussis* reveal host defensive and pathogen counter-defensive strategies**. Proc Natl Acad Sci USA. 2000 97:13847-13852.

DOMINGOS,R.M. **Avaliação do Ensaio de Ganho de Peso Corpóreo em camundongos no controle de qualidade da Vacina Tríplice Bacteriana-DTP**. Rio de Janeiro: INCQS,2006. 54p.il Monografia (Especialização) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 7. ed.2011. v.2 1299-3310p.

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

GUPTA, R.K; SAXENA, S. N; SUNITI, B; et al. **The effects of purified components and lipopolysaccharide on the results of the mouse weight gain test**. J. Biol. Stand. 1988. 16: 321-331.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3300.002**: marcação padrão de animais de laboratório. Rev 05. Rio de Janeiro, 2010.5p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3330.005**: determinação do peso corporal de animais de laboratório (roedores). Rev.04 Rio de Janeiro, 2009.7p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3330.007**: ensaio de ganho de peso em camundongos para determinação da toxicidade inespecífica da vacina contra coqueluche. Rev.04 Rio de Janeiro, 2008. 9p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3330.008**: teste para determinação da toxicidade inespecífica para soros e vacinas. Rev.5 Rio de Janeiro, 2011.11p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3340.002**: boas práticas em experimentação animal. Rev.9 Rio de Janeiro, 2011.14p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3340.004**: identificação de caixas e gaiolas. Rev.6 Rio de Janeiro, 2010.8p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3340.008**: método de eutanásia para animais de laboratório. Rev.2 Rio de Janeiro, 2010. 8 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

KENDRICK, P.L. **Use of Alum-Treated Pertussis Vaccine, and of Alum-Precipitated Combined Pertussis Vaccine and Diphtheria Toxoid, for Active Immunization.** 1942 Jun;32 (6): 615-26.

MADSEN, T. **Vaccination against whooping cough.** JAMA, 1933. V. 10, 187P.

MARTINS, F.J. **Estudo sobre a reação inflamatória produzida pela vacina contra difteria, o tétano e a coqueluche (DTP) em camundongos.** Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ,2006.

PITTMAN, M. **Influence of preservatives, of heat, and of irradiation on mouse protective activity and detoxification of pertussis vaccine.** J Immunol, 1952.69: 201-216p.

REDHEAD, K. ; SEAGOATT, V. **The effects of purified components of Bordetella pertussis in the weight gain test for the toxicity testing of pertussis vaccines.** J Biol Stand. 1986 14:57-65.

VAN, STAATE; VAN DE KAPPELLE, I.; VAN DER GUN, J.W; et al. **Collaborative study on test systems to assess toxicity of whole cell pertussis vaccine.** National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, 1997.

VERONESI, R; FOCACCIA, R; editores. **Tratado de infectologia.** 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

VUOLO, A. M; LUSTIGMAN, B. **Assay of pertussis vaccine reactivity factors by Measurement of the paw swelling response, endotoxin and histamine sensibilizing factor.** Biologicals, 1993. 21: 45-52p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Expert Committee on Biological Standardization, BS/96.** 1832, Geneva, - 11 October 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Position paper on pertussis vaccines.** WER, 2005 No 4,80:29-40.