

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

**ESTUDO DA APLICABILIDADE DO TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS NA
DETECÇÃO DE PIROGÊNIOS NA VACINA CONTRA FEBRE AMARELA**

Rio de Janeiro

2016

Elaine Cristina Azevedo Navega

**ESTUDO DA APLICABILIDADE DO TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS NA
DETECÇÃO DE PIROGÊNIOS NA VACINA CONTRA FEBRE AMARELA**

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 para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Orientadoras: Isabella Fernandes Delgado

Katherine Antunes de Mattos

Rio de Janeiro

2016

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Navega, Elaine Cristina Azevedo

Estudo da aplicabilidade do teste de ativação de monócitos na detecção de pirogênios na vacina contra febre amarela / Elaine Cristina Azevedo Navega. – Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2016.

120 f. : il.

Dissertação (Mestrado profissional em Vigilância Sanitária)– Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2016.

Orientadoras: Isabella Fernandes Delgado; Katherine Antunes de Mattos

1. Monócitos. 2. Pirogênios. 3. Alternativas aos Testes com Animais. 4. Endotoxinas. 5. Vacina contra Febre Amarela. I. Título

Applicability Study Monocyte Activation Test the Detection Pyrogen in Vaccine against Yellow Fever.

Elaine Cristina Azevedo Navega

**ESTUDO DA APLICABILIDADE DO TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS NA
DETECÇÃO DE PIROGÊNIOS NA VACINA CONTRA FEBRE AMARELA**

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 para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

Kátia Christina Leandro (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Marcelo Salabert Gonzalez (Doutor)
Universidade Federal Fluminense

Daniel da Silva Guedes Júnior (Doutor)
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos

Isabella Fernandes Delgado (Doutora) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Katherine Antunes de Mattos (Doutora) - Orientadora
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus, por ter me dado força para superar as dificuldades e pela presença em todos os momentos da minha vida. Sem Ele nada seria possível.

Ao meu amado esposo Deniley, pela compreensão, paciência e amor acima de tudo.

À minha linda filha Maria Eduarda e aos meus sobrinhos queridos Nicholas e Iago, que muito alegam minha vida e me fazem sorrir nos momentos difíceis.

Aos meus pais Antônio e Kátia, pelo amor, apoio e compreensão.

À minha irmã Renata e eterna amiga de todos os dias.

Às minhas orientadoras Dra. Isabella Fernandes Delgado e Dra. Katherine Antunes de Mattos, pela orientação, ensinamentos e principalmente pela confiança.

Ao apoio financeiro recebido pela RENAMA - Projeto MCTI/CNPq 402552/2011-3.

À toda equipe do Departamento de Farmacologia e Toxicologia do INCQS, à Cristiane Silva e ao Octavio Augusto Presgrave pela colaboração na orientação deste trabalho contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional; à Izabela e à Débora pelo apoio nas atividades de bancada; à Luciana por conseguir doadores de sangue para a realização do trabalho e a todos os doadores de sangue.

Às coordenadoras e professores do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS.

À Vice-diretora de qualidade Maria da Luz Fernandes Leal e à chefe do departamento de qualidade Darcy Akemi Hokama, pela oportunidade.

Ao chefe e amigo Igor Barbosa pelo incentivo de iniciar o curso e encorajamento para continuar a jornada.

À toda equipe da SEBIO, pela compreensão durante minha ausência no decorrer do curso, e em especial à Alessandra, ao Ricardo e ao Vitor pelo apoio nas atividades do teste de atividade biológica para alfaepoetina.

À minha amiga de classe Glísia pelos momentos vividos de aprendizado e companheirismo.

Às minhas amigas Simone e Adriana pelo ombro amigo nas horas precisas.

À amiga Nívea pelas confortáveis e doces palavras de Deus.

À Cláudia Dias pela força no momento mais difícil da caminhada.

Ao Daniel, Érika, Jaline, Mariana e Leonardo pela ajuda nos ensaios de LAL.
À todos que participaram direta ou indiretamente no desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

A necessidade de alternativas ao uso de animais no teste de pirogênio é guiada pelo princípio dos 3R's, culminando na aceitação pela Farmacopeia Europeia (FE) do método alternativo *in vitro*, o Teste de Ativação de Monócitos (MAT). Respeitando esta premissa, o MAT utiliza como matriz, fontes de monócitos humanos sendo considerado um método promissor e eficiente por excluir riscos inerentes à extrapolação inter-espécies, detectar amplo espectro de pirogênios e suprir limitações dos testes atuais, *i.e* o Teste de Endotoxina Bacteriana (LAL) e o Teste de Pirogênio em coelhos (RPT). Apesar das vantagens abordadas, alguns obstáculos técnico-científico-regulatórios devem ser transpostos para a implantação efetiva do MAT na rotina industrial, em especial, de produtos biológicos. Neste contexto, o Laboratório de Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos (Seção de Controle Biológico) em colaboração com o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), visando reforçar a melhoria nos ensaios de controle de qualidade e fortalecer cientificamente o uso dos testes alternativos seguindo os pré-requisitos regulamentados pelas farmacopeias, selecionou de seu portfólio como alvo de estudo, a vacina contra a febre amarela (VFA) como primeiro modelo de aplicabilidade do MAT em vacinas virais por: (1) ser o carro-chefe de Bio-Manguinhos, (2) apresentar processo de produção complexo, com fatores críticos de interferência como uso de vírus vivo e resíduos de componentes de processos (ovos embrionados) e (3) possibilitar potencial investigativo de outras fontes pirogênicas não detectadas pelo método descrito na monografia da vacina. Os métodos farmacopeicos descritos para o MAT utilizando IL-1/sangue criopreservado, IL-6/sangue fresco e a proposta de método para rotina industrial utilizando IL-6/ sangue criopreservado, foram validados conforme requisitos da FE. A verificação produto-específica foi realizada com a VFA/10 doses e fatores interferentes avaliados através da máxima diluição válida. Após determinação da diluição, o método quantitativo foi aplicado aos lotes vacinais, com interpretação entre os sistemas de leitura e matrizes do MAT e LAL. Os dados mostram reprodutibilidade do teste utilizando diferentes doadores e medidores de pirogenicidade (IL-6/IL-1) frente ao estímulo da endotoxina. Após verificação da aplicabilidade do MAT à VFA com diluição 1:10, demonstramos que os sistemas utilizando sangue criopreservado (IL-1 β /IL-6) respeitam os limites de recuperação da endotoxina e se mostraram mais adequados

do que o sistema IL-6/sangue fresco. Os resultados quantitativos da resposta pirogênica no produto - determinada pelo MAT - correspondem àqueles observados pelo LAL. Os dados demonstram a aplicabilidade do MAT em vacinas, sendo o modelo VFA compatível com a utilização.

Palavras-chave: Teste de Ativação de Monócitos. Pirogênio. Métodos Alternativos. Vacina contra febre amarela. Endotoxina. Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

The need for alternatives to animal use in pyrogen test is guided by the principle of the 3R's, culminating in the acceptance by the European Pharmacopoeia (EP) of the Monocyte Activation Test (MAT). Respecting this premise, human monocytes sources are used at MAT, which is considered a promising and efficient alternative method. This method is effective for exclude inherent risk of the interspecies extrapolation, detects a broad spectrum of pyrogens and overcomes limitations of current tests, i.e. the Bacterial Endotoxin Test (LAL) and Pyrogen Test conducted in Rabbits (RPT). Despite the advantages mentioned above, some technical-scientific and regulatory obstacles must be overcome for effective implementation of MAT in the industrial routine, especially for biological products. In this context, the Quality Control Laboratory of Bio-Manguinhos (Biological Control Section) in collaboration with the National Institute for Quality Control in Health (INCQS) started this study aimed to improve the quality control process of biologicals and to consolidate the scientific development of alternative methods in this field, following requirements recommended by regulatory agencies. The vaccine against yellow fever (YFV) was selected to evaluate the applicability of MAT. The reasons for this choice includes: (1) YFV is the flagship product of Bio-Manguinhos's portfolio, (2) YFV's production is a complex process, with critical factors of interference such as, the use of live virus and the presence of residual process components (embryonated eggs), and (3) this study enables further investigations concerning other pyrogenic sources not detectable by the method described in the YFV's monograph. The pharmacopeial methods (MAT using IL-1/blood cryopreserved and IL-6/fresh blood) and the proposed method for industrial routine (IL-6/blood cryopreserved) were validated following the EP requirements. The product-specific verification was carried out with the YFV/10 doses and interfering factors was evaluated by the maximum valid dilution. After determining the dilution, the quantitative method was applied to vaccine lots, with interpretation between the reading systems of MAT and LAL. The data have shown the reproducibility test using different donors and pyrogenicity endpoints (IL-6/IL-1) compared to the stimulation of endotoxin. After assessing the applicability of YFV with the MAT 1:10 dilution, we demonstrated that systems using cryopreserved blood (IL-1 β /IL-6) respects the limits recovery of endotoxin and were more suitable than the IL-6 system/fresh blood. The quantitative results of the pyrogenic response in the

final product - determined by MAT - correspond to those observed by the LAL. The data demonstrate the applicability of MAT for batch release process of viral vaccines and that the YFV model is compatible with the use of this alternative method.

Keywords: Monocyte Activation Test. Pyrogen. Alternative Methods. Yellow fever vaccine. Endotoxin. Health Surveillance

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Distribuição geográfica do <i>Aedes aegypti</i> nas Américas 1930-2011	25
Figura 2: Distribuição Global do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	26
Figura 3: Transmissão da febre amarela silvestre e urbana	28
Figura 4: Fluxograma de produção e controle da VFA em Bio-Manguinhos	31
Figura 5: Extração de sangue do caranguejo <i>Limulus</i> para a produção do LAL.	42
Figura 6: Laboratórios participantes da RENAMA	49
Figura 7: Distribuição na placa cinética (azul claro). Em cinza claro: curva padrão de LPS (STD, <i>standard</i>); azul escuro: controle negativo (CN); amarelo: VFA: vacina contra febre amarela (VFA); laranja: VFA adicionada com LPS	55
Figura 8: Esquema de diluição das citocinas, conforme recomendação do fabricante (A) IL-1 β e (B) IL-6	65
Figura 9: Distribuição na placa de ELISA (azul claro). Em cinza claro: curva padrão (STD, <i>standard</i>); cinza escuro: controle negativo (CN) e curva de LPS; amarelo: VFA: vacina contra febre amarela (VFA); laranja: vacina contra febre amarela adicionada de 0,5 UE/ mL	67
Figura 10: Curva padrão de endotoxina em sangue criopreservado para a detecção de IL-1 β	76
Figura 11: Teste de interferentes para VFA pura e diluída em 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 1/160 e 1/320 através da resposta da liberação de IL-1 β para o estímulo de 0,5 UE/mL de LPS de <i>E.coli</i> O55:B5 por ELISA em sangue criopreservado	79

Figura 12: Curva padrão de endotoxina em sangue criopreservado para a detecção de IL-6	85
Figura 13: Teste de interferentes para VFA pura e diluída em 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 1/160 e 1/320 através da resposta da liberação de IL-6 para o estímulo de 0,5 UE/mL de LPS de <i>E.coli</i> O55:B5 por ELISA em sangue criopreservado	87
Figura 14: Curva padrão de endotoxina em sangue fresco para a detecção de IL-6	94
Figura 15: Análise de correlação da resposta de liberação de IL-1 β e IL-6 frente ao LPS em sangue criopreservado	99
Figura 16: Análise de correlação da resposta de liberação de IL-1 β e IL-6 frente aos lotes de VFA em sangue criopreservado	100
Figura 17: Análise de correlação entre os ensaios LAL e MAT, baseados nos dados de recuperação de LPS (%). (A) Análise de correlação LAL x MAT IL-1 β e (B) LAL x MAT/IL-6	101

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Substâncias capazes de induzir febre	34
Quadro 2	Sistemas validados para o MAT	48
Quadro 3	Parâmetros e especificações dos resultados	56
Quadro 4	Variantes dos sistemas do ensaio MAT	57
Quadro 5	Preparação da curva padrão de endotoxina	58
Quadro 6	Contato da VFA com sangue fresco em microtubos	62
Quadro 7	Contato da VFA com sangue criopresevado em microtubos	63
Quadro 8	Sumário do teste quantitativo de endotoxinas (Método A)	68
Quadro 9	Parâmetros e especificações dos resultados	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise de lotes da VFA/10 doses produzidas por Bio-Manguinhos pela técnica de LAL	72
Tabela 2: Perfil hematológico dos doadores de sangue utilizados como matriz monocítica nos ensaios de MAT	74
Tabela 3: Avaliação dos critérios de aceitação da matriz monocítica para a detecção de IL-1 β em sangue desafiado pela curva de LPS	77
Tabela 4: Teste de interferentes para VFA no MAT utilizando sangue criopreservado com detecção de IL-1 β como parâmetros de leitura	78
Tabela 5: Avaliação de endotoxina na VFA pelo método quantitativo A no MAT utilizando sangue criopreservado com detecção de IL-1 β	80
Tabela 6: Análise intra-ensaios de lotes da VFA no MAT utilizando sangue criopreservado com detecção de IL-1 β como parâmetros de leitura	81
Tabela 7: Análise inter-ensaio de lotes da VFA no MAT utilizando sangue criopreservado com detecção de IL-1 β	83
Tabela 8: Avaliação dos critérios de aceitação da matriz monocítica para a detecção de IL-6 em sangue criopreservado desafiado pela curva de LPS	85
Tabela 9: Recuperação de endotoxina (%) obtida no teste interferente para VFA no MAT utilizando sangue criopreservado com detecção de IL-6 como parâmetros de leitura	86
Tabela 10: Análise comparativa da diluição da VFA para a recuperação de endotoxina (%) obtida no teste interferente no MAT utilizando sangue criopreservado com detecção de IL-6 como parâmetros de leitura	88
Tabela 11: Recuperação de endotoxina (%) obtida em 10 lotes de para VFA no MAT utilizando sangue criopreservado com detecção de IL-6 como parâmetros de leitura	90

Tabela 12: Análise intra-ensaio de lotes da VFA no MAT utilizando sangue criopreservado com detecção de IL-6 como parâmetros de leitura	91
Tabela 13: Análise inter-ensaio de lotes da VFA no MAT utilizando sangue criopreservado com detecção de IL-6 como parâmetros de leitura	92
Tabela 14: Avaliação dos critérios de aceitação da matriz monocítica para a detecção de IL-6 em sangue fresco desafiado pela curva de LPS	94
Tabela 15: Análise comparativa da diluição da VFA para a recuperação de endotoxina (%) obtida no teste interferente no MAT utilizando sangue fresco com detecção de IL-6 como parâmetros de leitura	96
Tabela 16: Análise intra-ensaio de lotes da VFA no MAT utilizando sangue fresco com detecção de IL-6 como parâmetros de leitura	97
Tabela 17: Análise comparativa dos resultados intra-ensaios dos lotes da VFA e LPS no MAT utilizando sangue criopreservados pela detecção de IL-1 β e IL-6 como parâmetros de leitura	98
Tabela 18: Análise comparativa dos resultados inter-ensaios dos lotes da VFA e LPS no MAT utilizando sangue criopreservados pela detecção de IL-1 β e IL-6 como parâmetros de leitura.	98
Tabela 19: Análise comparativa dos resultados de recuperação (%) nos ensaios de LAL e MAT em sangue criopreservado com parâmetro de leitura IL-1 β e IL-6	101
Tabela 20: Comparação entre métodos de detecção de pirogênios	105
Tabela 21: Variantes dos sistemas do ensaio MAT.	109

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
3Rs	Reduction, Refinement, Replacement - Redução, Refinamento, Substituição
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BRACVAM	Centro Brasileiro de Validação de Método Alternativo
BET	Bacterial Endotoxin Test - Teste de Endotoxina Bacteriana
C	Concentração da solução teste
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CQ	Controle de Qualidade
D.O.	Densidade Ótica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods - Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos
ELC	Limite de endotoxina
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay – Teste de Imunoabsorção
EPI	Programa de Imunização Estendido
FA	Farmacopeia Americana
FB	Farmacopeia Brasileira
FBrit	Farmacopeia Britânica

FE	Farmacopeia Europeia
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
HSA	Human Serum Albumin - Albumina Humana Sérica
i.e.	isto é
ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods – Comitê de Coordenação Interagências sobre Validação de Métodos Alternativos
IFN- γ	Interferon – gama
IL- 6	Interleucina-6
IL-1 β	Interleucina-1beta
INCQS	Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde
Kg	Quilograma
LACOM	Laboratório de Controle Microbiológico
LAL	Lisado de Amebócitos de Limulus
LD	Limite de Detecção
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Ácido Lipoteicóico
MAT	Monocyte Activation Test - Teste de Ativação de Monócitos
MDP	Muramilpeptídeos
mL	Mililitro
MM6	MONO MAC 6 - Linhagem celular monocítica humana
MVD	Máxima Diluição Válida
NaCl	Cloreto de Sódio
NEP	Non-Endotoxin Pyrogen - Pirogênio Não Endotoxina
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAG	Produto Acabado a Granel
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell - Células Mononucleares do Sangue Periférico
pg	Picograma
PNI	Programa Nacional de Imunizações
RENAMA	Rede Nacional de Método Alternativo

SPF	Specific Pathogen Free - Livre de Patógenos Específicos
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLR	Toll Like receptors - receptores do tipo Toll
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha - Fator de Necrose Tumoral alfa
UE	Unidade de Endotoxina
UEE	Unidade de Equivalência de Endotoxina
USP-24NF19	United States Pharmacopeia National Formulary - Formulário Nacional da Farmacopeia dos Estados Unidos da América
VFA	VFA
v/v	volume por volume
WB	Whole Blood - Sangue Total
WFI	Water for Injection – Água para injeção

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	HISTÓRICO DA FEBRE AMARELA.....	23
1.2	EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO DA FEBRE AMARELA.....	26
1.2.1	Atual situação epidemiológica.....	28
1.3	A VACINA CONTRA FEBRE AMARELA.....	29
1.3.1	PRODUÇÃO DA VACINA CONTRA FEBRE AMARELA.....	30
1.4	CONTROLE DE QUALIDADE.....	32
1.5	PIROGÊNIO.....	33
1.5.1	Métodos de detecção de pirogênios.....	35
1.6	TESTE DE PIROGÊNIO <i>IN VIVO</i>	36
1.7	PRINCÍPIO DOS 3Rs E MÉTODOS ALTERNATIVOS.....	38
1.8	TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA.....	39
1.8.1	Limitações do teste LAL.....	40
1.9	TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS.....	42
1.9.1	Vantagens do teste de ativação de monócitos.....	45
1.9.2	Validação do MAT.....	46
2	JUSTIFICATIVA	50
3	OBJETIVOS	52
3.1	OBJETIVO GERAL.....	52
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
4	METODOLOGIA	53
4.1	VACINA CONTRA FEBRE AMARELA.....	53
4.2	TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA.....	53
4.2.1	Preparo da curva de endotoxina.....	54

4.2.2	Preparo das amostras.....	54
4.2.3	Método Cinético-Cromogênico.....	55
4.2.4	Parâmetros de Validação (USP, GUIDERLINE FDA, FE).....	56
4.3	TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS.....	57
4.3.1	Preparo da curva de endotoxina.....	57
4.3.2	Cálculo da Máxima Diluição Válida.....	58
4.3.3	Coleta do sangue total.....	59
4.3.3.1	<i>Contagem das células sanguíneas.....</i>	60
4.3.3.2	<i>Preparo sangue fresco.....</i>	60
4.3.3.3	<i>Preparo sangue criopreservado.....</i>	60
4.3.4	Preparo das amostras para teste de interferentes.....	61
4.3.5	Contato da vacina febre amarela com sangue fresco.....	61
4.3.6	Contato da vacina febre amarela sangue criopreservado.....	62
4.3.7	Dosagem de citocinas IL-1 β e IL-6.....	63
4.3.7.1	<i>Preparo da curva-padrão de citocinas.....</i>	64
4.3.7.2	<i>Preparo da placa de ELISA.....</i>	66
4.4	TESTE QUANTITATIVO DE ENDOTOXINA.....	67
4.4.1	Cálculo da concentração de endotoxina.....	68
4.4.2	Parâmetros de validação (ICCVAM, FE).....	69
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA UTILIZADA NO MAT.....	70
5	RESULTADOS.....	72

5.1	TESTE DE ENSAIO DE ENDOTOXINA BACTERIANA.....	72
5.2	QUALIFICAÇÃO DOS DOADORES DE SANGUE.....	73
5.3	MÁXIMA DILUIÇÃO VÁLIDA PARA A VACINA CONTRA A FEBRE AMARELA.....	74
5.4	TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS EM SANGUE TOTAL CRIOPRESERVADO COM DETECÇÃO DE IL-1 β	75
5.4.1	Qualificação das células provenientes do sangue criopreservado para o ensaio com IL-1 β	75
5.4.2	Teste de fatores interferentes para IL-1 β	77
5.4.3	Teste quantitativo utilizando o sistema MAT: sangue criopreservado/ IL-1 β	79
5.4.4	Análise intra-ensaios (IL-1 β).....	81
5.4.5	Análise inter-ensaio (IL-1 β).....	82
5.5	TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS EM SANGUE TOTAL CRIOPRESERVADO COM DETECÇÃO DE IL-6.....	83
5.5.1	Qualificação das células provenientes do sangue criopreservado para o ensaio com IL-6.....	84
5.5.2	Teste de fatores interferentes para IL-6.....	86
5.5.3	Teste quantitativo utilizando o sistema MAT: sangue criopreservado/ IL-6.....	88
5.5.4	Análise intra - ensaio (IL-6).....	90
5.5.5	Análise inter-ensaio (IL-6).....	91
5.6	TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS EM SANGUE TOTAL FRESCO COM DETECÇÃO DE IL-6.....	93
5.6.1	Qualificação das células provenientes do sangue fresco para o ensaio com IL-6.....	93
5.6.2	Método A: teste quantitativo (IL-6).....	95
5.6.3	Análise intra-ensaio (sangue fresco – IL-6).....	96
5.7	ANÁLISE COMPARATIVA IL-1 β e IL-6.....	97

5.8	ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE MAT E LAL.....	100
6	DISCUSSÃO.....	103
6.1	APLICABILIDADE DO MAT.....	106
6.2	O MÉTODO MAT E SEUS VARIANTES.....	107
7	CONCLUSÃO.....	114
	REFERÊNCIAS.....	115

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO DA FEBRE AMARELA

A febre amarela é uma doença infecciosa não contagiosa (MONATH, 2005), de origem africana (MS, 2010). É uma doença hemorrágica viral aguda transmitida por artrópodes infectados. A cor amarela no nome refere-se à icterícia que afeta alguns pacientes (MS, 2016).

Devido à falta de relatos clínico e epidemiológicos, não se sabe exatamente em que época teve início. Presume-se que em 1648, tenha sido o primeiro registro da doença de febre amarela por causa de uma epidemia febril que atacou os conquistadores espanhóis na península de Yucatan, no México. No século XVII, essa doença dizimou milhares de vidas em extensas epidemias urbanas no continente da África e da América do Sul. Nos séculos XVIII e XIX, os Estados Unidos foram acometidos repetidas vezes por epidemias devastadoras originadas do tráfico de navios negreiros procedentes das Índias Ocidentais e do Caribe (MS, 2016).

Durante muitos anos, acreditou-se que as pessoas eram contaminadas por febre amarela através de miasmas ou pelo desenvolvimento espontâneo da doença nos navios negreiros. Em 1881, foi sugerido pelo médico cubano Carlos Finlay que o *Aedes aegypti* transmitia a febre amarela. Em 1900, foi comprovada essa hipótese da transmissão da doença homem a homem pelo vetor *Aedes aegypti* por Walter Reed. A partir desses dados, iniciou-se a primeira campanha contra febre amarela no interior de São Paulo por Emílio Ribas em 1901, adotando medidas específicas contra esse vetor (FERREIRA, KV, 2011; MS, 2010).

A febre amarela foi considerada um grande problema de saúde pública e a descoberta de sua transmissão provocou uma série de campanhas contra o vetor da doença nos centros urbanos mais atingidos, dentre eles: Havana, Panamá, Santos e Rio de Janeiro, neste o médico sanitário Oswaldo Cruz empregou as mesmas estratégias que William Gorgas em Cuba que adotou medidas de controle organizados pelas brigadas sanitárias, conhecidas como brigadas “mata mosquito”,

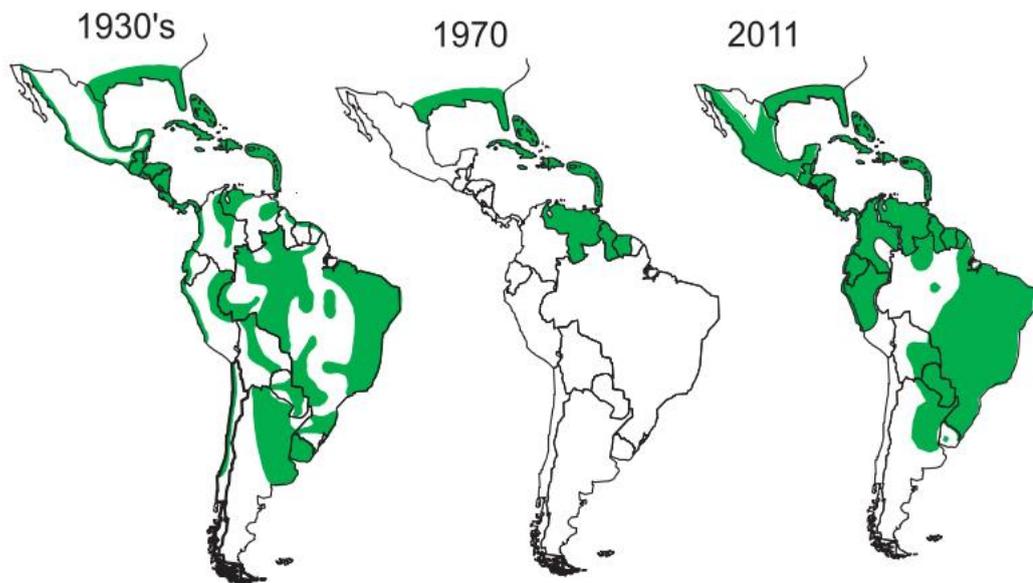
que eliminavam o vetor através da fumigação com vapores de enxofre e quebravam os recipientes contendo larvas de mosquitos. Em 1908, a campanha de Oswaldo Cruz conseguiu eliminar o mosquito *Aedes aegypti* no Rio de Janeiro erradicando a febre amarela por 20 anos (HOMMA, 2002).

Em 1928 e 1929, período em que a febre amarela voltou a ser um problema de saúde pública (Figura 1), momento que foi marcado pela mudança de atitude em relação a essa doença, levando a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) investir nas atividades de pesquisa, intensamente, gerando conhecimento sobre a forma silvestre da febre amarela, a sua vacina e as campanhas de controle e erradicação do *Aedes aegypti* (BENCHIMOL, 2001).

O *Aedes aegypti* foi considerado erradicado no Brasil em 1958 durante a XV Conferência Sanitária Panamericana, porém foi reintroduzido em 1967 na cidade de Belém, capital do Pará. Em 1973, o último foco do mosquito foi novamente eliminado. Assim, o vetor foi novamente considerado erradicado do território brasileiro. Em 1976, houve nova reintrodução do *Aedes aegypti* em Salvador e, nos anos seguintes, foram registrados a presença do vetor em quase todos os estados brasileiros (BRASIL, 1999).

Na década entre 1980 e 1990, houve um aumento drástico no número de casos de febre amarela, posteriormente entre os anos de 2000 a 2004 epidemias continuaram a ocorrer, onde 16 países retomaram uma ou mais epidemias (GLUBER, 2004). Em 2011, Duane Gubler – professor de doenças emergentes em uma escola de medicina em Singapura – destacou que a comodidade deu início a um período de “crescente apatia e complacência” para o controle de doenças infecciosas (Figura 1).

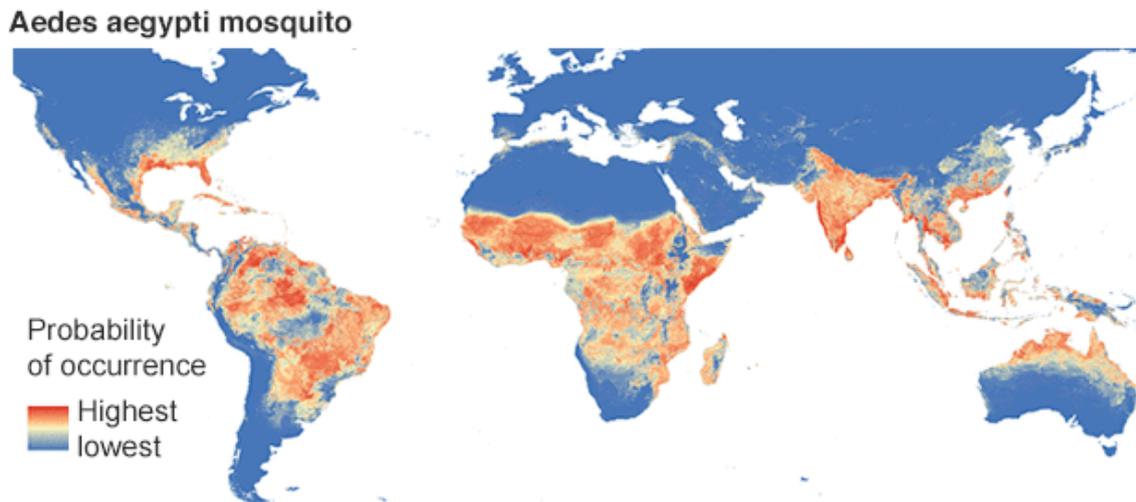
Figura 1: Distribuição geográfica do *Aedes aegypti* nas Américas 1930 - 2011. As áreas endêmicas do *Aedes aegypti* estão assinaladas com a cor verde.



Fonte: GUBLER, 2011.

Além de o mosquito *Aedes aegypti* ter sido o vetor responsável pela transmissão da febre amarela, ele também pode transmitir os vírus que causam a dengue, chikungunya e zika. Oswaldo Cruz combateu os focos do mosquito o tempo inteiro, incluindo o verão, e não apenas em momentos de epidemia. Segundo a recomendação de Ana Luce Girão, historiadora e pesquisadora da Casa de Oswaldo Cruz (COC-Fiocruz), isso deveria acontecer até os dias de hoje, ela acredita que se essa prática tivesse sido seguida, os vírus poderiam ser menos letais (O GLOBO, 2016). Na Figura 2, podemos observar a maior probabilidade de ocorrência do mosquito *Aedes aegypti* em distribuição global.

Figura 2: Distribuição Global do mosquito *Aedes aegypti*. Cor laranja: maior probabilidade de ocorrência do vetor.



Fonte: <http://eadm.news/2016-01-31-14-12-27/dwelling-inside-uganda-s-forest-where-the-zika-virus-originated> acessado em 31/03/2016.

1.2 EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO DA FEBRE AMARELA

A febre amarela é uma doença febril aguda, de curta duração (no máximo 12 dias) e de gravidade variável, cujo agente etiológico é um arbovírus do gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae* (do latim *flavus* = amarelo) (MONATH, 2005). A forma grave caracteriza-se clinicamente por manifestações de insuficiência hepática e renal, que podem levar à morte.

A febre amarela apresenta dois ciclos de transmissão epidemiologicamente distintos: a febre amarela silvestre e a febre amarela urbana (Figura 3). As diferenças estão delimitadas pela localização geográfica da ocorrência; vetor responsável pela transmissão e pelo hospedeiro. No ciclo silvestre, a febre amarela é endêmica em macacos, transmitida por mosquitos vetores do gênero *Haemagogus* e os do gênero *Sabethes*, habitantes de florestas úmidas. Neste ciclo, durante o período de viremia, os macacos ao serem picados repassam novos vírus para os

mosquitos silvestres. O homem ao entrar na mata fica vulnerável a picadas de mosquitos infectados e ao ser picado completa o ciclo de transmissão: macaco, mosquito silvestre e homem (MS, 2015).

Em relação ao ciclo urbano, a febre amarela é transmitida ao homem pelo vetor *Aedes aegypti*, que se reproduz em águas limpas. A virose é introduzida nas cidades pelo homem em período de viremia, que ao ser picado pelo *Aedes aegypti* transmite a infecção para o vetor, este após um período de incubação, transmite o vírus a outras pessoas debilitáveis e inicia-se o ciclo de transmissão: homem, mosquito e homem (MS, 2015).

A febre amarela urbana não ocorre no país desde 1942, tendo somente ocorrência de febre amarela silvestre (MS, 2015). O mosquito *Aedes aegypti* retornou ao Brasil no final da década de 1970. Enquanto esse vetor encontrava-se erradicado, havia uma relativa segurança quanto a não possibilidade de reurbanização do vírus amarílico (MS, 2014). Entretanto, atualmente as áreas silvestres estão sendo ocupadas pelo processo de globalização, que resulta em um aumento da concentração populacional e gera um crescimento urbano desordenado com dificuldades na eliminação e controle efetivo do vetor urbano.

Essa situação favorece o risco de reurbanização da doença e a preocupação da febre amarela de se tornar novamente um problema de saúde pública. Esses fatores mais a existência da transmissão silvestre dificultam a erradicação total da febre amarela (MS, 2014).



Fonte: http://www.em.com.br/app/noticia/tecnologia/2011/01/24/interna_tecnologia,205479/vacina-contr-a-febre-amarela-pode-ganhar-novos-parametros.shtml

1.2.1. Atual situação epidemiológica

Recentemente, houve uma estimativa de 84.000 a 170.000 casos de febre amarela por ano e 29.000 a 60.000 mortes por esta doença. Este levantamento foi realizado em áreas tropicais da África e da América Latina, com uma população combinada de mais de 900 milhões de pessoas. Na África, estima-se que 508 milhões de pessoas vivem em 31 países em risco. O restante da população em risco estão em 13 países da América Latina, como Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador e Peru com maior risco. Sem a vacinação, o número de casos seria muito maior. A doença nunca foi relatada na Ásia, mas a região também encontra-se em risco devido condições encontradas para a transmissão (MS, 2016).

O vírus da febre amarela reemergiu no Brasil a partir de julho de 2014. Alguns casos de epizootias em primatas não humanos para a doença de febre amarela foram confirmados e registrados, estes casos foram associados à ocorrência de casos humanos. No período de monitoramento entre julho de 2014 a junho de 2015 foram confirmados sete casos humanos da doença: Goiás (5), Pará (1) Mato Grosso do Sul (1) e quatro epizootias em primatas não humanos: Tocantins (2), Goiás (1), Pará (1).

Durante a retomada do monitoramento para o período entre 2015 e 2016, outras epizootias em primatas não humanos foram confirmadas em Tocantins - Porto Nacional (1) e Palmas (1), Goiás - Novo Brasil (1) e no Distrito Federal - Regiões Administrativas de Ceilândia (1) e da Candangolândia (1), evidenciando a intensa atividade do vírus amarílico no país, principalmente na região Centro-Oeste (MS, 2016).

Na África, uma epidemia de febre amarela alastrou a partir de Luanda para 16 das 18 províncias do país. Segundo dados da OMS, as autoridades de saúde em Angola reportaram, até 22 de junho de 2016, 3294 casos suspeitos de febre-amarela, incluindo 347 óbitos. Apesar das campanhas de vacinação, a circulação do vírus persiste em vários distritos (OMS, 2016).

1.3 VACINA CONTRA FEBRE AMARELA

Em 1927, o vírus da febre amarela foi isolado de um paciente africano de nome Asibi (cepa Asibi) por Stokes, Bauer e Hudson que após passagens sequenciais e atenuação da virulência originou a cepa 17D e as duas subcepas 17D-204 e 17DD. Essas subcepas são utilizadas para a produção das atuais vacinas contra a febre amarela (MONATH, 2005). A primeira produção foi registrada em 3 de fevereiro de 1937 (POST, 1996) e usada em grande escala durante o surto de febre amarela ocorrido no município de Varginha/MG.

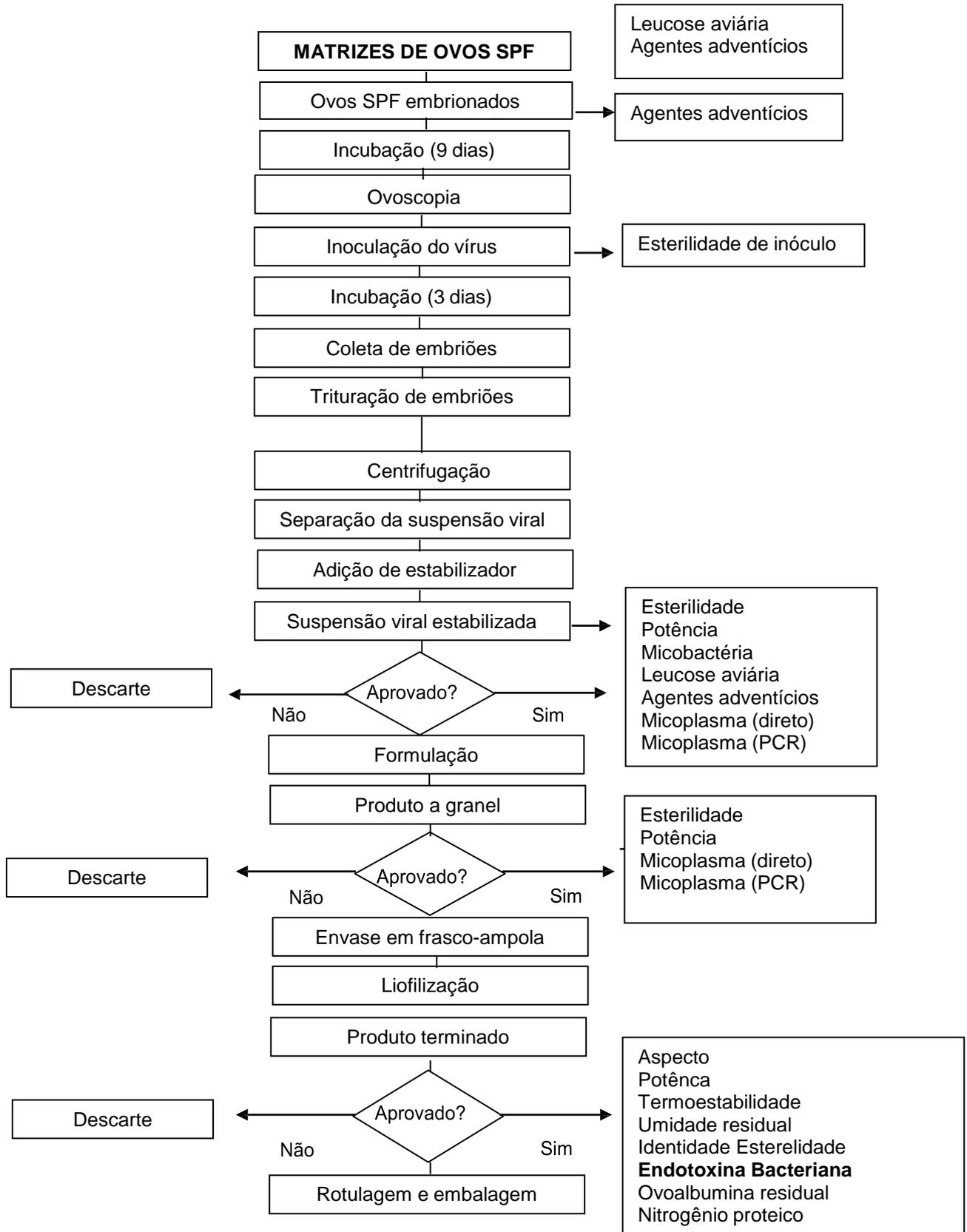
Desde 1937, o Instituto de Tecnologia em Imunológicos (Bio-Manguinhos) – Fiocruz é reconhecido internacionalmente como fabricante da vacina contra a febre amarela (anti-amarílica). As preparações vacinais são obtidas em seus laboratórios a partir da cepa atenuada 17D do vírus da febre amarela, cultivada em ovos

embrionados de galinha livres de agentes patogênicos, demonstrando segurança e eficácia de acordo com as normas estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) durante sete décadas. A OMS recomenda a imunização no calendário básico de vacinas para crianças maiores de seis meses de idade em áreas endêmicas. No Brasil o Programa Nacional de Imunizações (PNI) alterou a idade recomendada para crianças com nove meses em áreas endêmicas e de transição. Em maio de 2014, a OMS alterou o Regulamento Sanitário Internacional, estendendo a validade do certificado internacional de vacinação contra febre amarela dos atuais 10 anos para toda a vida do vacinado. Esta nova regulamentação terá força legal a partir de junho de 2016 (WHO, 2016; MS, 2014).

1.3.1 Produção da vacina contra febre amarela

A produção e o controle da vacina contra febre amarela (VFA) são realizados em diversas etapas, conforme representadas no fluxograma (Figura 4). Os ovos são classificados como férteis e originados de plantéis de galinhas livres de patógenos específicos (do inglês, *specific pathogen free* - SPF), os mesmos são incubados em temperatura e umidade controladas. No 9º dia, ocorre a inoculação do vírus. Após esta etapa os ovos são incubados por mais 3 dias. Depois deste processo ocorre a coleta dos embriões, trituração e centrifugação para preparar a suspensão viral adicionam-se os estabilizadores, dando origem à suspensão viral estabilizada. São retiradas amostras desse produto intermediário para o controle de qualidade (CQ), em seguida a suspensão é armazenada em freezer -70°C. O processo de formulação destas suspensões para se obter o produto acabado a granel (PAG), ocorre quando os resultados do CQ se encontram satisfatórios, se algum frasco de suspensão obtiver resultado insatisfatório, o mesmo é descartado. As amostras do PAG também são analisadas pelo laboratório de controle microbiológico do CQ e após aprovação é realizado o envase, liofilização e originando o produto terminado, que também é controlado pelo CQ. Após a aprovação pelo CQ, os frascos são rotulados e embalados (CARVALHO, 2005).

Figura 4: Fluxograma de produção e controle da VFA em Bio-Manguinhos



Fonte: CARVALHO, 2005

1.4 CONTROLE DE QUALIDADE

O CQ de produtos biológicos caracteriza-se por um conjunto de medidas utilizadas para garantir a qualidade de cada lote, visando comprovar a qualidade desde a matéria-prima até a obtenção do produto final, tendo estas as especificações em cada produto distribuído para comercialização (NETTO, 2010; NETTO, 2011).

Este processo envolve vários ensaios específicos que asseguram a pureza, potência biológica, identidade do produto, esterilidade, contaminação com agentes adventícios (ex. micoplasma), endotoxina e por fim, a ausência de pirogênios. A contaminação por pirogênios pode ocorrer durante o processo de produção, tornando o CQ essencial para a saúde da população. Por outro lado, o incentivo dos programas de imunização aumentou o consumo de vacinas e exigiu o aperfeiçoamento dos mecanismos destinados a garantir sua qualidade (NETTO, 2010; NETTO, 2011).

Especificamente durante o processo produtivo da vacina de febre amarela, o CQ de Bio-Manguinhos atua na etapa de avaliação do produto terminado, conforme fluxograma demonstrado na Figura 4. A legislação nacional preconiza como teste de segurança de pirogênios, Teste *in vivo* de Pirogênio em Coelhos – RPT, do inglês *Rabbit Pyrogen Test* e o Teste de Endotoxina Bacteriana – BET, do inglês *Bacterial Endotoxin test*, também conhecido por *Limulus Amebocyte Lysate* – LAL (WEARY *et al*, 1982), sendo o LAL o ensaio preconizado pela Farmacopeia Brasileira para o controle da vacina de febre amarela. Embora seja essa a regulamentação nacional, o teste de endotoxina bacteriana em destaque (*i.e.* o LAL) possui algumas limitações, pois detecta somente pirogênios provenientes da parede celular de bactérias Gram-negativas, os lipopolissacarídeos – LPS, (*i.e.* as endotoxina), mas não detecta outros tipos de pirogênios, como por exemplo, os provenientes de bactérias Gram-positivas, fungos e vírus e apresenta interferências no caso de alguns produtos com alto teor de lipídios e proteínas (ICCVAM, 2008).

1.5 PIROGÊNIO

O termo pirogênio foi aplicado por Burdon Sanderson em 1875 por isolar substâncias livres de microrganismos vivos em carne podre, o que causou febre após inoculação em animais (CLOUGH, 1951). É considerado um contaminante que pode ser originado por diversas fontes, como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, vírus, materiais antigênicos e alguns medicamentos (Quadro 1).

Todos os produtos injetáveis de uso humano devem ser desprovidos de pirogênio (PRESGRAVE, 2003). Este contaminante é considerado um grave problema de saúde pública, pois pode provocar reação febril (INCQS, 2005), graves sinais de inflamação, falha de múltiplos órgãos, e até mesmo a morte (HARTUNG *et al*, 1997; DINARELLO, 2000; BEUTLER *et al*, 2003).

Quando um desses contaminantes entra em contato com o fluxo de sangue humano, estimula leucócitos a sintetizarem e a liberarem citocinas pró-inflamatórias como a Interleucina-1 β (IL-1 β), Interleucina-6 (IL-6), Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e Interferon- γ (IFN- γ) e são capazes de intervir no centro termorregulador do organismo e aumentar a temperatura corporal causando febre. Essas são as principais citocinas produzidas pelo organismo e são conhecidas como pirogênios endógenos (HOFFMANN *et al*, 2005; DANTAS, 2000).

A endotoxina é um pirogênio exógeno, conhecida como LPS, componente da parede celular de bactérias Gram-negativas, causadora de grande parte das contaminações, possui alto peso molecular (PINTO *et al*, 2003), é termoestável, tornando-se resistente aos processos térmicos da cadeia de esterilização (HARTUNG *et al*, 2001; HOFFMANN *et al*, 2005a; DANTAS, 2000).

Quadro 1: Substâncias capazes de induzir febre

PIROGÊNIOS
Lipopolissacarídeo (LPS)
Ácido lipoteicóico (LTA) e componentes da parede celular de bactérias Gram-positivas
Endotoxinas associadas a proteínas
Peptidoglicanos (componentes da parede celular da bactéria)
DNA da bactéria
Muramipeptídeos (MDP e outras subunidades de peptidoglicanos juntas com endotoxinas)
Porinas (proteínas da parede celular da bactéria)
Superantígenos
Exotoxinas
Lipoarabinomannans (derivado de micobactérias)
Componentes fúngicos (mananas, glucanas, manoproteínas)
Componentes do parasita (fosfonositol)
Vírus
Contaminação não microbiológica (citocinas, células, produtos de degradação)
Materiais sólidos (dispositivos médicos, plástico)
Medicamentos (esteróides, sais biliares, dapsona, citocinas)

Fonte: Adaptado de Hartung *et al*, 2001.

1.5.1 Métodos de detecção de pirogênios

A detecção de contaminação pirogênica é uma parte fundamental de testes de segurança de medicamentos nas indústrias farmacêuticas, laboratórios de referência e instituições de saúde. Em 1930 surgiu a produção de parenteral de grande volume e o teste de pirogênio passou a ser uma exigência. O primeiro teste de detecção oficial conhecido foi o RPT (WELSH *et al*, 1943; MCCLOSKY *et al*, 1943), método *in vivo* que apresenta uma baixa sensibilidade para pirogênios, além do uso de animais. Em consequência de várias limitações deste teste, métodos alternativos foram criados. O LAL refere-se à detecção de endotoxinas de bactérias Gram-negativas, com base na reação da coagulação da hemolinfa do caranguejo-ferradura. Entretanto, não foi possível substituir o RPT pelo LAL, sendo este incapaz de detectar pirogênios não-endotoxina (WUNDERLICH *et al*, 2014).

Até o final da década de 1940, a base científica da pirogenicidade e o conceito de pirogênios exógenos/endógenos haviam sido explorados com detalhes (DINARELLO, 2004). Descobriu-se que o corpo humano libera substâncias endógenas que causam febre em resposta a substâncias exógenas, como algum tipo de mecanismo de defesa do hospedeiro. Após 30 anos foi identificada a primeira IL-1 β , como pirogênio endógeno (AURON *et al*, 1984). No final dos anos 80, o primeiro recombinante IL-1 β tornou-se disponível, dando início ao desenvolvimento de testes alternativos pirogênicos que com células monocíticas incluindo métodos de sangue total (HARTUNG *et al*, 1995; HARTUNG *et al*, 1996). Ao compreender os mecanismos subjacentes da reação de febre em humano foi possível desenvolver testes que refletem os processos moleculares que ocorrem no corpo humano. Isto incluiu a identificação de pirogênios não-endotoxina (NEP – do inglês *non-endotoxin pyrogens*) e vários receptores para ambos os LPS e NEP.

Seguindo o propósito de métodos alternativos com maior segurança e eficiência, foi desenvolvido um método baseado no mecanismo de reação da febre em humano, o Teste de Ativação de Monócitos (*Monocyte Activation Test - MAT*), possui alta sensibilidade e tem amplo espectro na detecção de contaminantes, atualmente aceito como terceiro teste de pirogênios pela Farmacopeia Europeia (FE).

1.6 TESTE DE PIROGÊNIO *IN VIVO*

Para garantir a segurança, o ensaio de pirogênio é necessário para todos os produtos destinados a superar as barreiras naturais do corpo humano (DING *et al*, 2001), especificamente injetáveis e dispositivos médicos. Em 1912, o RPT foi introduzido na Farmacopeia Britânica (FBrit) após a observação de que a aplicação de composições injetáveis pode causar febre e outros efeitos adversos graves. O RPT foi capaz de refletir a pirogenicidade de bactérias contaminantes encontrados em produtos biológicos (PROBEY *et al*, 1945), permitindo um melhor controle dos produtos.

Em 1942, foi incorporada à Farmacopeia Americana (FA) – em sua 12ª edição - o primeiro método oficial para detecção de pirogênios (WILLIAMS, 2007). Apenas em 2001, a FA (USP 24/NF19 - *United States Pharmacopeia National Formulary*) modificou os critérios de avaliação do teste, tornando-os mais rigorosos (FA, 2001). Na FE, o teste de pirogênio foi publicado em 1971 e não sofreu alterações até o momento (FE, 1971, FE, 2007, FE, 2011). Em 1976, o teste de pirogênio em coelhos foi publicado pela primeira vez na Farmacopeia Brasileira (FB), 3ª edição, e a modificação dos critérios ocorreram em 2003 (FB, 1976; FB, 2003).

Em 1942, Co Tui, pesquisador de grande experiência com cães e coelhos, concluiu que para a realização do ensaio de pirogênio, o coelho é o melhor modelo animal para testar a ausência de pirogênio (WILLIAMS, 2007), sendo adotados como animal padrão para teste de segurança em pirogênios (TUI *et al*, 1942). Destacando que coelhos apresentam a mesma dose mínima que causa febre no homem correspondente a 1ng/Kg (5 UE/Kg) (HOCHSTEIN, 1990).

O princípio do teste de pirogênio *in vivo* é a observação da resposta febril em coelhos. Após injeção intravenosa da solução em análise, é medida a temperatura retal dos animais com intervalos de 30 minutos, por um período de 3 horas. Para cada amostra, são testados três coelhos e se nenhum dos coelhos apresentar aumento individual de temperatura $\geq 0,5^{\circ}\text{C}$, o produto atende às exigências para a ausência de pirogênio. O resultado sendo duvidoso é realizado uma continuação com mais cinco novos coelhos, neste caso, se no máximo três dos oito coelhos testados apresentarem aumentos $\geq 0,5^{\circ}\text{C}$ e se a soma dos oito

aumentos individuais de temperatura não ultrapassar 3,3°C, o produto atende às exigências para ausência de pirogênio (FB, 2010).

O teste *in vivo* está propenso às interferências de fatores relacionados ao ambiente externo como ruídos, temperatura ambiente e a fatores relacionados ao animal como diferenças de respostas entre raças, sexo e a variabilidade biológica contribuindo para resultados falso-positivos e falso-negativos (FB, 2010).

Um resultado positivo no RPT demonstra contaminação com pirogênios de acordo com os requisitos e as definições das monografias. Contudo, ainda existe uma lacuna entre a pirogenicidade observada no coelho e a pirogenicidade esperada nos humanos. Devido as diferenças entre as espécies, alguns produtos como os biológicos para uso humano podem causar febre em seres humanos, mas não causar febre em coelhos e vice-versa (HARTUNG *et al*, 2001).

No entanto, o RPT possui vários inconvenientes. A sensibilidade dos coelhos às preparações de endotoxina depende da estirpe utilizada e as condições experimentais como idade, sexo, habitação. A estirpe a ser usada não é definida nas farmacopeias. Se o volume mais alto permitido for injetado (10 mL/kg de peso corporal), dependendo das características do medicamento, o limite de detecção resultante é de 500 pg por 10 mL ou 50 pg / mL, enquanto que o limiar da febre em humanos encontra-se cerca de 30 pg / mL (GREISMAN *et al*, 1969), e para muitos medicamentos o volume testado é significativamente menor. Os medicamentos injetados por via intravenosa devem ser livres de pirogênios. Para medicamentos parenterais, administrado por via subcutânea ou por via intramuscular em volumes muito pequenos como, por exemplo, as vacinas, o máximo de concentração de endotoxinas aceitável tem que ser definido para fins de controle de qualidade. Contudo, o RPT não é adequado para o controle de tal limite, uma vez que não é um teste quantitativo, dando apenas aprovação ou reprovação, e é bem menos padronizado (BELLENTANI, 1982). O RPT não é adequado para muitos produtos, tais como os medicamentos radiofarmacêuticos, agentes quimioterapêuticos, analgésicos, antipiréticos, citocinas, dopamina e agentes imunossupressores (HARTUNG *et al*, 1998; HARTUNG *et al*, 2001). Além disso, medicamentos que influenciam os mecanismos centrais ou periféricos da regulação da temperatura corporal, tais como antipirético, esteróides, ou dopamina (CRANSTON *et al*, 1972; VAN MIERT *et al*, 1978; SZREDER, 1997; GAGALO *et al*, 1995, 1996) não pode ser testada no RPT. O mesmo aplica-se a medicamentos que podem causar reações

imunológicas como imunoglobulinas (HUSZAR *et al*, 2002), suspensões oleosas ou detergentes. O RPT também não pode ser usado nas preparações celulares, tais como componentes do sangue e de células estaminais (HARTUNG *et al*, 2001).

1.7 PRINCÍPIO DOS 3Rs E MÉTODOS ALTERNATIVOS

Na obra “*Principles of Humane Experimental Technique*”, de Russel e Burch, 1959, surgiu o princípio dos 3R’s (“*Reduction*”, “*Refinement*”, “*Replacement*”). Esses princípios, que em português se consagraram como redução, refinamento e substituição, norteiam a busca constante de métodos que visam ao aperfeiçoamento dos processos envolvidos na experimentação, reduzindo o número e o desconforto dos animais; ou, até mesmo, substituindo por completo e com segurança, os testes *in vivo* (COELHO, 2012).

Na década de 60, não foi dada atenção necessária para a concepção dos 3R’s. Alguns acontecimentos nesta área ocorreram nos anos 70, mas a introdução de leis e convenções nacionais e internacionais baseadas no programa 3R’s foi observada somente a partir de 1980. No final desta década, novas leis e protocolos foram criados e adotados em diversos países, não somente reconhecendo a concepção de Russell e Burch, mas também identificando as obrigações legais e morais envolvidas na busca de reduzir, refinar e substituir, sempre que possível, os procedimentos envolvendo os animais de experimentação (EXECUTIVE COMMITTEE OF THE CONGRESS, 2000).

Todo este movimento em benefício do programa 3R’s resultou na fundação de diversas instituições que ofereceram encontros e seminários a fim de estimular o aumento de publicações científicas, promover o desenvolvimento, validação e a discussão de alternativas para a substituição das técnicas usuais. Nas últimas décadas, esse princípio vem sendo aprovado e reconhecido mundialmente por órgãos reguladores e autoridades internacionais. A implantação e desenvolvimento de métodos alternativos é um passo fundamental para o cumprimento da legislação.

Algumas leis na regulamentação de métodos alternativos existentes são conhecidas como a lei Arouca aprovada no Brasil, Lei nº 11.794 de 08 de

outubro de 2008, onde seu principal objetivo é zelar pela ética na utilização de animais em pesquisa e ensino. Através dessa lei, houve a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Este conselho é responsável pelo credenciamento de instituições que utilizam animais, cria normas brasileiras referentes ao uso de animais de laboratório, e ainda, monitora e avalia o ingresso de métodos alternativos ao uso de animais no ensino e na experimentação (RENAMA, 2016).

No sentido de concretizar os objetivos dos métodos alternativos, diversas ações e metas foram propostas e têm contribuído para a aceitação e a evolução desta filosofia na área experimental. Vale ressaltar que métodos alternativos *in vitro* validados e aceitos com propósito regulatório para substituir testes realizados com animais, ainda são considerados muito mais uma meta que realidade, embora tais conceitos já sejam amplamente incorporados por pesquisadores, por organizações não governamentais e por algumas agências regulamentadoras. Desta forma, a finalidade principal do programa 3R's é servir como um conceito unificador, um desafio e uma oportunidade para a obtenção de benefícios científicos, econômicos e humanitários (HARTUNG, 2000).

1.8 TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA

Em 1885, foi observado que a hemolinfa do caranguejo-ferradura (*Limulus polyphemus*) formava um gel quando retirada do animal. Após um ano, foi relatado por Loeb que as células sanguíneas circulantes na hemolinfa do *Limulus* (amebócitos) quando expostas a substâncias estranhas, coagulava (HOWELL, 1885; LOEB, 1903). Verificou-se que a coagulação era realizada através do contato com a parede de bactérias de origem Gram-negativas (BANG, 1956). Em 1964, Bang e Jack Levin revelam que as endotoxinas (LPS) são responsáveis pela coagulação da hemolinfa do *Limulus* (LEVIN *et al*, 1964).

O teste LAL trouxe consigo um avanço significativo, reforçou a segurança dos consumidores e substituiu o RPT, consideravelmente. No entanto, devido a um mecanismo completamente diferente, o LAL não reflete febre - principal indicador da resposta humana - quando se trata de substâncias pirogênicas em humanos. O LAL

reage de maneira muito diferente ao LPS em comparação com a resposta imune. Não há correlação da atividade de LAL com a expressão de citocinas, como TNF- α , IL-1 β e IL-6 em células mononucleares (BRANDENBURG *et al*, 2009).

O LAL foi introduzido na FA em 1980 e na FB, em 1996 (PINTO *et al*, 2003; FREITAS, 2008) e apresenta-se a partir de três técnicas distintas (USP, 2009):

- (1) Gelificação – baseia-se na formação de gel;
- (2) Turbidimétrico – baseado no desenvolvimento de turbidez após a clivagem de um substrato endógeno;
- (3) Cromogênico cinético– baseado no desenvolvimento de cor após o tempo de reação da clivagem de um complexo peptídeo-cromógeno. É o método mais sensível.

Geralmente o limite de detecção é de 3 pg/mL, isto é, 0,03 UI/mL. Os sistemas mais sofisticados do LAL mostram uma maior sensibilidade podendo detectar abaixo de 0,005 EU/mL (LAUD-SHARP, 1990; FENNRICH, 1998).

Atualmente mais de 90% dos testes para detecção de pirogênios são realizados pelo LAL, o que o torna economicamente um método alternativo bem-sucedido. Em 2014, o mercado avaliou o LAL em \$ 462.38 milhões de dólares americanos com taxa de crescimento anual de 12,23% podendo chegar a 823.14 milhões em 2019 (MARKETS & MARKETS, 2015).

1.8.1 Limitações do teste LAL

Conforme informações supracitadas, o LAL fundamenta-se na presença de endotoxina, ele não possibilita a completa substituição do teste *in vivo* (POOLE *et al*, 2003). O teste de LAL possui outras limitações, isto é, quantifica somente endotoxina livre. Nas vacinas, a endotoxina pode se ligar às proteínas plasmáticas do produto; desta forma elas não são detectadas no teste LAL, podendo produzir resultado falso-negativo (SCHINDLER, *et al*, 2003; SCHINDLER, 2009).

Outra limitação é que o ensaio só pode ser realizado com amostras líquidas, os testes realizados com materiais sólidos como dispositivos médicos apresentam

dificuldades e apenas soluções de lavagem podem ser testadas (ROSS *et al*, 1982; ROSLANSKY *et al*, 1991). O ensaio também apresenta problemas com líquidos de diálise (BOHRER *et al*, 2001), lipossomas (HARMON *et al*, 1997), nanopartículas (SMULDERS *et al*, 2012), e as terapias celulares (MONTAG-LESSING *et al*, 2010). Os fármacos que interferem com o sistema de coagulação, isto é, através da inibição (ligação de cátions divalentes tais como o ácido etilenodiaminotetracético, citrato, inibidores da protease) ou a valorização (elevado teor de proteínas, proteases), não podem não ser testados no LAL (COOPER *et al*, 1997; DUNÉR, 1995). Outros fatores que também interferem na detecção de pirogênios pelo LAL é uma série de componentes que se ligam à endotoxina do plasma e mascaram o LPS fornecendo resultado falso-negativo, como exemplos, hidróxido de alumínio e produtos que apresentam elevado conteúdo de proteínas, já o EDTA e o citrato são inibidores de enzima e glucanas podem gerar resultados falso-positivo por mimetizar a endotoxina (OCHIAI *et al*, 2001; PARK *et al*, 2005).

Outra desvantagem do LAL é a retirada dos caranguejos-ferradura de seu habitat natural (costa do Oceano Atlântico dos Estados Unidos até o Golfo do México) ou até mesmo de cativeiros. E, após a retirada do sangue (Figura 5), os animais são retornados ao mar causando a morte de aproximadamente 30.000 *Limulus* por ano nos Estados Unidos, aumentando a ameaça da população desta espécie animal (HOFFMANN *et al*, 2005a, SCHINDLER *et al*, 2009).

Figura 5: Extração de sangue do caranguejo *Limulus* para a produção do LAL



Fonte: <http://historiasnaturais.wordpress.com/2012/01/31/sangue-real/>. Acessado em 02/04/2016.

1.9 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS

O MAT baseia-se na ativação de células humanas monocíticas através da contaminação por pirogênicos levando a liberação de mediadores endógenos determinados por ELISA (HARTUNG *et al*, 2001), como citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, TNF- α , IL-1 β e IL-6. Estas citocinas têm um papel importante na patogênese da febre. Conseqüentemente, o MAT detecta contaminantes pirogênicos e pró-inflamatórios, incluindo endotoxinas de bactérias Gram-negativas e contaminantes não-endotoxina, incluindo padrões moleculares associados a agentes patogênicos (PAMPs), derivadas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, vírus e fungos, relacionados com o processo de produtos e entidades biológicas ou químicas. Uma vez que os contaminantes não-endotoxinas são de natureza desconhecida, o nível de contaminação é expresso em unidades de endotoxina equivalente, determinado por comparação com as respostas de endotoxina.

Em 1984 foi iniciado por Dinarello e colaboradores, o teste de liberação de citocinas baseado na ativação de monócitos *in vitro* por linhagens celulares ou sangue humano, fundamentado no princípio do mecanismo da febre, através

da quantificação de mediadores inflamatórios envolvidos neste processo para a busca de métodos alternativos (PESGRAVE, 2009). As citocinas liberadas são medidas por kits comerciais, através de ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA*) (HARTUNG *et al*, 2001; SILVA *et al*, 2005; PESGRAVE, 2009; FE, 2010).

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) foram utilizadas pela primeira vez para detectar pirogênios através da liberação de citocinas *in vitro* (DUFF *et al*, 1982), tais como IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Desde então, houve interesse de desenvolver outros estudos relacionados com a liberação de citocinas em diferentes sistemas de ensaio, usando sangue humano total, sangue criopreservado, PBMCs, linhas de células monocíticas (MM6 – MONO MAC 6), ou linhagem aguda humana celular de leucemia monocítica (THP-1) como uma fonte para os monócitos humanos (POOLE *et al*, 1988b; HARTUNG *et al*, 1996; SCHINDLER *et al*, 2004; SCHINDLER *et al*, 2006, DANESHIAN *et al*, 2009).

Em 1990 foi demonstrada por Hansen e Christensen a utilização de PBMC, como indicador sensível de contaminação por endotoxina. Além disso, o método utilizando o sistema PBMC/IL-1 β detectou bactérias Gram-positivas. Comparado com o teste *in vivo* e o LAL, o MAT foi considerado um modelo promissor substitutivo ao uso de animais. Adicionalmente, outro estudo com IL-6 foi considerado sensível quando comparado com o teste *in vivo* (HANSEN, 1990; CHRISTENSEN, 1990).

Outra demonstração foi realizada em 1991, por Taktak e colaboradores, que desenvolveram um método de pirogênio *in vitro* fundamentado na liberação de IL-6 a partir de células MM6. Este método IL-6/MM6 positivou três lotes de Albumina Humana Sérica (HSA). Essas mesmas substâncias foram analisadas no LAL e no RPT, ambos os testes resultaram em amostras negativas. A sugestão atribuída pelos autores é que o mecanismo IL-6/MM6 representa uma importante alternativa e pode ser um método mais adequado para testar contaminação de produtos parenterais, principalmente para aqueles que não podem ser detectados pelo LAL e RPT, tais como HSA, nas condições experimentais avaliadas (ICCVAM, 2008; MELANDRI *et al*, 2010).

Em 1996, Hartung e Wendel chegaram à conclusão que após estimulação do sangue total com bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (ou componentes desses microrganismos como o LTA e enterotoxinas), havia liberação de IL-6 de

forma dependente à concentração do estímulo. A partir desses resultados o teste do sangue total foi desenvolvido tomando por base o princípio mecanístico da febre, através da quantificação de mediadores inflamatórios envolvidos neste processo (HARTUNG *et al*, 1995; HARTUNG *et al*, 1996.). Este método surge como uma proposta direta de substituição do coelho na detecção da contaminação pirogênica em produtos injetáveis (HARTUNG *et al*, 2001).

O MAT foi implementado pela FE em 2010, monografia 2.6.30 (EDQM, 2010), a partir desta publicação, tem sido considerado terceiro teste para detecção de endotoxinas Gram-negativas e NEPs. A Comissão de Coordenação Interagências sobre a Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM, 2008, 2009) orientou em condições similares a FE. A mesma posição foi aplicada pelo FDA do inglês *Food and Drug Administration* (FDA, 2009). As empresas que fornecem produtos que tenham a necessidade de ensaios pirogênicos, podem utilizar métodos alternativos que apresentam vantagens em termos de precisão, sensibilidade, seletividade, ou outras circunstâncias especiais. Métodos alternativos devem ser submetidos à validação apropriada e atingir resultados equivalentes ou melhores em comparação com o método padrão (HARTUNG, 2015).

O MAT emprega a resposta de citocinas através dos monócitos do sangue para a detecção de contaminantes microbiológicos para finalmente substituir o RPT, que ainda utiliza um número muito grande de coelhos. Muitas pessoas têm estudado para implementação desse teste visando poupar cerca de 400 mil coelhos por ano no mundo, esses animais ainda são utilizados para detecção de pirogênios. Desde a aceitação oficial do MAT pela FE, nos Estados Unidos o número de animais utilizados para o RPT não caiu, mas aumentou cerca de 10.000 a 170.000 coelhos. O problema é que o MAT ainda não está sendo utilizado para testar dispositivos médicos e alguns outros produtos, devido a falta de implementação para aplicação do método pelas autoridades competentes (HARTUNG, 2015).

Silva e colaboradores (2015) realizou um estudo recente analisando amostras de soros hiperimunes no MAT, LAL e RPT. Os resultados foram comparados e apresentaram semelhanças entre eles, tanto os resultados negativos quanto positivos. No RPT, existiram casos de suspeitas nos resultados, necessitando uma continuação no ensaio com mais cinco coelhos, tornando o teste mais demorado. No MAT, o resultado obtido foi de rápida detecção, mais sensível e seguro em relação ao RPT. Os resultados mostraram que o uso dos coelhos pode ser substituído pelo

MAT nos testes de pirogênios para soro hiperimune (SILVA, 2016). Um exemplo dessa redução no laboratório do INCQS é que 90% dos coelhos utilizados para teste de pirogênio são destinados para testes relacionados a esse produto (SILVA, 2015a).

1.9.1 Vantagens do Teste de Ativação de Monócitos

Os testes *in vitro* são de baixo custo comparado com o gasto gerado na criação e manutenção de animais de laboratório utilizados para o teste *in vivo*. Além de serem mais rápidos e de fácil execução, obtendo um maior número de amostras analisadas em menor tempo (HARTUNG *et al*, 2001; HOFFMANN *et al*, 2005). Com relação ao LAL, vários estudos apontam que o MAT possui a vantagem de detectar um amplo espectro de pirogênios (HASIWA *et al*, 2013; WUNDERLICH *et al*, 2014) e ser aplicável a grande parte dos produtos biológicos (PERDOMO - MORALES *et al*, 2011; HASIWA *et al*, 2013) e amostras ambientais (KINDINGER *et al*, 2005).

O teste de ativação de monócitos em sangue total (SCHINDLER *et al*, 2009), tem a vantagem de não necessitar de cultura de células e não apresentar artefatos durante a preparação, as células são mantidas no plasma. Em contraste com o LAL, o sangue reflete a potência de diferentes tipos de LPS em coelhos (FENNRICH *et al*, 1999). Uma vez que uma suspensão de células é utilizada, o sangue como um dos reagentes pode ser colocado em contato com qualquer material, incluindo os dispositivos médicos (HASIWA *et al*, 2007) ou filtros contendo amostras de ar (KINDINGER *et al*, 2005).

No estudo de validação, a linhagem celular mostrou desvios e mudanças na capacidade de resposta pirogênica, onde as células de THP-1 não obtiveram resultados satisfatórios. Com a introdução de sangue total criopreservado (SCHINDLER *et al*, 2004), a preocupação com a disponibilidade de doadores foi superada. O MAT também tem sido testado com sangue de coelho permitindo uma avaliação na detecção de pirogênios em diferentes espécies (HARTUNG *et al*, 1998). Vários componentes que não podem ser detectados no LAL ou RPT, como

por exemplo, o hidróxido de alumínio em vacinas (CARLIN *et al*, 2005), parenterais lipídicos (SCHINDLER *et al*, 2006), medicamentos tóxicos ou imunomoduladora (DANESHIAN *et al*, 2006), água e soluções de diálise e componentes com estruturas como glucanas (DANESHIAN *et al*, 2006). É o único teste para o qual estão disponíveis versões de kits padronizados internacionalmente.

O mecanismo subjacente na reação de febre humana pode ser provocado não só por LPS, mas também por muitas outras substâncias com origem a partir de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Muitos outros compostos, provenientes de leveduras, fungos, vírus, parasitas foram demonstrados para induzir uma reação imunológica humana e por causar problemas quando supera a proteção da barreira natural do corpo humano. Recentemente, a relevância de pirogênios não-endotoxinas como ácido lipoteicóico (LTA), DNA bacteriano (CPG-motriz), peptidoglicana, receptor Toll-like sintético (TLR) agonistas, ou pirogênios endógenos passaram a ter mais importância, principalmente como uma causa de reações adversas em seres humanos (HENDERSON E WILSON, 1996).

1.9.2 Validação do MAT

A substituição do RPT pelo MAT deve ser considerada como utilização de um método alternativo para a substituição de um ensaio farmacopeico, que é o método oficial onde as normas da Farmacopeia Europeia são baseadas. De acordo com a autoridade competente, métodos alternativos podem ser utilizados para fins de controle, desde que os métodos utilizados possuam dados inteligíveis para alcançar o cumprimento das normas das monografias pelos métodos oficiais. Em caso de dúvida ou discordância, os procedimentos são sugeridos para validação de um método para o MAT diferente daquele indicado na monografia. A presença de fatores interferentes deve ser testada nas amostras e utilizar pelo menos três lotes de produção. O MAT deve ser aplicado a todos os novos produtos destinados a utilização parentérica que devam ser testados quanto à presença de contaminantes de ativação de monócitos de acordo com os requisitos da FE (FE, 2010).

A validação específica do produto é necessária, sendo um substituto para o ensaio pirogênico do coelho. Os produtos farmacêuticos que contêm contaminantes

pirogênicos ou pró-inflamatórios não-endotoxinas mostram frequentemente curvas dose-resposta inferiores em comparação com curvas de dose-resposta a endotoxina (FE, 2010).

As empresas devem fornecer qualquer validação com dados sobre a aplicabilidade do MAT para as substâncias e formulações de seu interesse. Esses dados incluem detalhes de preparação das amostras e de todos os procedimentos necessários para eliminar os fatores que interferem.

O MAT foi aprovado pelo ECVAM em 2006 e incluído na FE em 2010 (EDQM, 2010) como um terceiro método para detectar endotoxina em medicamentos parenterais com o objetivo de validar caso-a-caso cada produto específico a fim de demonstrar equivalência para RPT (ICCVAM, 2008).

A partir de 2005 foram padronizadas e validadas cinco variantes para o MAT (Quadro 2) utilizando diferentes fontes de monócitos, de sangue total fresco e linhagens celulares para parenterais de grande volume (HOFFMANN *et al*, 2005). Este estudo de validação foi complementado por Schindler e colaboradores (2006) com o uso do sangue total criopreservado o qual foi de grande importância, pois contornou a limitação do teste de necessitar de voluntários saudáveis a cada ensaio. Além disso, o processo de criopreservação o ensaio mais seguro, aumentando a confiabilidade da resposta dos monócitos e facilitando o transporte e armazenamento das amostras (SCHINDLER *et al*, 2004). Estas variantes foram aceitas pelo ECVAM e pelo ESAC - ECVAM *Scientific Advisory Committee*, como alternativas ao RPT para detecção de pirogênio endotoxina (ECVAM, 2006), e provou ter um limite de detecção inferior ao RPT. O MAT é mais preciso e eficiente em termos de custo e tempo, sendo também capaz de detectar pirogênios de origem Gram-positiva cumprindo os critérios de qualidade para detecção pirogênica segundo relatório do workshop ECVAM (HARTUNG *et al*, 2001). O MAT fornece resultados confiáveis e reprodutíveis para muitos produtos finais (SPREITZER *et al*, 2002, ANDRADE *et al*, 2003). Como o MAT pode detectar diferentes pirogênios de endotoxinas, os resultados devem ser apresentados como unidades equivalentes de endotoxina (UEE) por mL (UEE/mL) (MONTANG *et al*, 2007).

Apesar de o MAT ter comprovado sua eficiência em detectar todos os tipos de pirogênio, o ICCVAM concluiu que:

I - O MAT não foi adequadamente avaliado para detectar endotoxinas

para um número suficiente de produtos farmacêuticos e não foi avaliado para nenhum produto biológico ou artigos de saúde;

II - Não há dados suficientes que suportem a habilidade do MAT em detectar pirogênios não endotoxinas;

III - O teste pode ser utilizado para detectar pirogênios em drogas parenterais humanas desde que caso a caso, sujeito a validação para cada produto específico.

Quadro 2: Sistemas validados para o MAT

Testes	Sistemas	Efeitos avaliados pela dosagem por ELISA
WB/IL-1 β	WB (<i>Whole Blood</i>) Sangue Total Humano	Interleucina-1 β
Cryo WB/IL-1 β	Cryo/WB (<i>Cryopreserved Whole Blood</i>) Sangue Total Humano Criopreservado	Interleucina-1 β
WB/IL-6	WB (Sangue Total Humano)	Interleucina-6
PBMC/IL-6	PBMC (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>) Células Mononucleares do Sangue	Interleucina-6
MM6/IL-6	Linhagem Celular Monocítica	Interleucina-6

Fonte: ICCVAM, 2008

A avaliação da confiabilidade e da relevância de alguns métodos foi

desenvolvida pelo ECVAM e possui aceitação internacional (HOFFMANN, 2005b). No Brasil temos o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), uma instituição fruto da parceria com a Fiocruz com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Criado em 2012, o BraCVAM está sediado no INCQS, organiza a expertise e a demanda nacional por métodos alternativos em pesquisas científicas, junto com o CONCEA e a Rede Nacional de Métodos Alternativos - RENAMA (INCQS, 2014). Atualmente, são dezenove laboratórios associados ao RENAMA, dentre eles o Laboratórios de CQ de Bio-Manguinhos - FIOCRUZ, que visam reforçar a melhoria nos ensaios de controle da qualidade e fortalecer cientificamente o uso dos testes alternativos seguindo os pré-requisitos regulamentados pelas farmacopeias (Figura 6).

Figura 6: Laboratórios participantes RENAMA. Associados em maio de 2015.



Fonte: RENAMA, 2016. <http://renama.org.br>. Acessado em: 05/04/2016.

2 JUSTIFICATIVA

A VFA tem como finalidade conferir proteção individual e coletiva, conter a propagação geográfica na prevenção de epidemias da doença e impactar de forma positiva na promoção da saúde da população.

Essa vacina - na apresentação de 10 doses - foi selecionada do portfólio de Bio-Manguinhos devido à febre amarela ainda ser um problema de saúde pública de âmbito nacional e internacional, com recomendação da OMS para incorporação da vacina ao Programa de Imunização Estendido (EPI). Atualmente, Bio-Manguinhos é o principal fornecedor de vacinas do MS, sua produção é feita a partir da previsão anual do PNI, entretanto pela pré-qualificação da vacina da febre amarela pela OMS, Bio-Manguinhos detém o direito de fornecer esse imunobiológico para as Agências das Nações Unidas além de governos e instituições, totalizando hoje, mais de 70 países sendo consolidado como o maior fornecedor de vacinas contra a febre amarela para as Américas Latina e Central, e um dos maiores em todo o mundo.

Os produtos imunobiológicos utilizados pelo PNI, seja de produção nacional ou internacional, são necessariamente analisados lote a lote pelo INCQS, esse trabalho realizado pelo Instituto é de extrema importância e resulta em um progresso de inserção internacional, onde o mesmo participa e coordena estudos colaborativos na adequação de metodologias de controle de produtos imunobiológicos na Rede Regional Nacional de Laboratórios Oficiais de Controle de Qualidade de Vacinas (RRNLCQV), com o apoio do Sistema Regional de Vacinas da Organização Panamericana de Saúde (SIREVA/OPAS), contando com a existência dos principais laboratórios da América Latina (NETTO, 2010).

Os testes laboratoriais realizados nos lotes de VFA incluem desde a determinação do teor de umidade residual, até a avaliação da segurança. Neste contexto, o teste de endotoxina bacteriana será incluído para avaliação da

aplicabilidade frente ao teste de ativação de monócitos, no sentido de viabilizar um método adicional para detecção de pirogênios conforme recomendação das agências de validação internacionais.

Além disso, com o intuito de atuar no avanço tecnológico e na garantia da segurança da vacina, a incorporação do MAT como teste de segurança para a vacina contra a febre amarela visa aprimorar o seu controle da qualidade e servir como possibilidade para a implementação da técnica em outros produtos do portfólio de Bio-Manguinhos, que ainda utiliza coelhos para a detecção de pirogênios, tornando o controle de qualidade mais específico, preciso e eficiente.

Este estudo contribuíra para reduzir a falta de dados apontada pelo ICCVAM em relação à aplicabilidade do MAT para produtos biológicos e sua capacidade na detecção de pirogênios não endotoxinas contribuindo para a substituição do teste em coelhos. Portanto, foram utilizados diferentes lotes da vacina não modificada ou contaminada artificialmente com pirogênios no MAT e LAL, simulando uma situação real e caracterizando a performance de cada teste em seu nível de segurança na detecção de uma potencial contaminação destas amostras.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicabilidade do teste de ativação de monócitos para identificação de endotoxinas em VFA comparando com a metodologia descrita na monografia do produto.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Estabelecer curva concentração-resposta de LPS pelo MAT em sangue criopreservado/IL-1 β e IL-6 e sangue fresco/IL-6;
- B) Avaliar a aplicabilidade do MAT em relação à VFA em sangue criopreservado/IL-1 β e IL-6 pelo ensaio de fatores de interferentes;
- C) Avaliar a aplicabilidade do MAT na detecção de LPS - em sangue criopreservado/IL-1 β e IL-6 e sangue fresco/IL-6 – em amostras de VFA utilizando o método quantitativo descrito na FE;
- D) Analisar comparativamente os resultados inter-ensaios obtidos no sangue criopreservado/IL-1 β e IL-6 e sangue fresco/IL-6 e determinar as melhores condições de ensaio;
- E) Comparar os resultados obtidos no MAT com aqueles obtidos, na rotina de controle de qualidade da VFA em Bio-Manguinhos, pelo método do LAL.

4 METODOLOGIA

4.1 VACINA CONTRA FEBRE AMARELA

Para os ensaios de MAT foram utilizados 10 lotes da vacina contra febre amarela VFA/10 doses produzidas pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) e aprovados durante a rotina do controle de qualidade realizada no Laboratório de Controle Microbiológico (LACOM) pelo LAL.

Para reconstituição da vacina foram adicionados 5 mL de diluente, conforme as instruções do fabricante, para obter o equivalente a dose humana. Porém, para os testes de MAT, uma solução de NaCl 0,9% apirogênica (Halex/Star lote nº 84795) foi utilizada na reconstituição da vacina de modo a garantir a ausência de possíveis interferentes na análise.

4.2 TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA

A avaliação de endotoxinas nas amostras da VFA utilizadas neste trabalho foi realizada pelo LAL através do método Cinético-Cromogênico quantitativo utilizado na rotina do controle de qualidade da VFA no LACOM.

O LAL foi realizado para avaliar o potencial pirogênico nos lotes da VFA desafiadas no MAT, uma vez que o ensaio de pirogênio em coelhos não se aplica a este produto, segundo as normativas de compêndio. Todos os parâmetros referentes à validação do LAL foram previamente validados no LACOM, sendo o nível de interferência da vacina em cada ensaio assegurado utilizando uma solução de LPS padrão para contaminação exógena na concentração de 5 UE/mL.

4.2.1 Preparo da curva de endotoxina

O padrão de endotoxina utilizado no ensaio foi o LPS de *E. coli* O55:B5 (Charles River, Endosafe, Charleston, SC). Este foi reidratado com a quantidade de água para injetáveis (WFI – do inglês, *Water for Injection*) indicada no certificado fornecido pelo fabricante, de forma a obter uma concentração de 50 UE de endotoxina padrão/mL. O padrão foi agitado por 15 minutos antes de realizar as diluições da curva e utilizado imediatamente.

A partir da solução de endotoxina (50 UE/mL), uma curva-padrão foi preparada através de diluição seriada em solução salina 0,9%, nas concentrações de 5; 0,5; 0,05 e 0,005 UE/mL. Cada diluição foi homogeneizada por 3 minutos e imediatamente aplicadas no volume de 100µL nos poços correspondentes a curva-padrão. Para o controle negativo foram adicionados 100 µL de WFI previamente aprovada.

4.2.2 Preparo das amostras

Para análise do lote de VFA, 3 frascos foram reconstituídos com WFI e diluídos na proporção de 1:5 (v/v) conforme validação da VFA realizada pelo LACOM. Como controle positivo do ensaio, as amostras foram contaminadas propositalmente com LPS exógeno. Foram transferidos 100µL para cada poço sendo à disposição das amostras, controles positivos e negativos ilustrados na Figura 7. A contaminação com o LPS nas amostras foi realizada pela adição de 10 µL de endotoxina padrão na concentração de 50 UE/mL, de modo a obter de uma concentração final de 5,0 UE/mL.

A taxa de recuperação do LPS no produto é um dos parâmetros que garante a credibilidade do ensaio, devendo este estar entre 50 e 200% conforme demonstrado no quadro 3. Esse parâmetro garante a ausência de interferentes na amostra que possam inibir ou potencializar a quantificação de endotoxinas.

Figura 7: Distribuição na placa cinética (azul claro). Em verde claro: curva padrão de LPS (STD, *standard*); azul escuro: controle negativo (CN); amarelo: VFA: vacina contra febre amarela (VFA); laranja: VFA adicionada com LPS.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD 1	STD 1	STD 1	VFA								
B	STD 2	STD 2	STD 2	VFA								
C	STD 3	STD 3	STD 3	VFA								
D	STD 4	STD 4	STD 4	VFA								
E	STD 5	STD 5	STD 5	VFA								
F				VFA								
G				VFA								
H	CN	CN	CN	VFA								

4.2.3 Método Cinético-Cromogênico

A detecção de endotoxina pelo método de LAL foi realizada pelo método cromogênico-cinético, utilizando o reagente ENDOCHROME-K, que foi reidratado com a quantidade de água apirogênica conforme indicação do fabricante (Charles River, Endosafe). O reagente foi adicionado no volume de 100 μ L na placa ilustrada na figura 7, após a distribuição das amostras e controles e a leitura realizada no programa EndoScan-V™ na leitora BioTek ELx808 reader, imediatamente após distribuição do reagente.

4.2.4 Parâmetros de Validação (USP, GUIDERLINE FDA, FE)

Quadro 3: Parâmetros e especificações dos resultados

Parâmetros	Especificação
Coeficiente de relação da curva padrão “R”	-1 a -0,98
Inclinação da curva padrão (slope) “a”	-0,3 a -0,1
y-interseção da curva padrão “b”	2,5 a 3,5
% de recuperação do controle positivo do produto	50 a 200%
% do coeficiente da variação das replicatas	<10%

A amostra foi considerada satisfatória quando o valor de endotoxina encontrado foi menor que os valores recomendados.

4.3 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS

O MAT foi realizado utilizando sangue humano fresco e criopreservado como matrizes monocíticas e sistemas de detecção de citocinas IL-1 β e IL-6 como indicadores da presença de LPS liberadas nos sobrenadantes de matrizes estimuladas ou não com LPS em amostras da VFA.

Os ensaios foram realizados conforme parâmetros descritos na FE (2010) e validados pelo ICCVAM, sendo 3 sistemas de pirogenicidade avaliados, conforme descrito no quadro 4.

Quadro 4: Variantes dos sistemas do ensaio MAT

Teste	Sistema	Leitura	Fonte
<i>Cryo WB/IL-1β*</i>	Sangue Total Humano Criopreservado	Interleucina-1 β	ICCVAM, 2008, FE, 2010
<i>WB/IL-6*</i>	Sangue Total Humano	Interleucina-6	ICCVAM, 2008, FE, 2010
<i>Cryo WB /IL-6</i>	Sangue Total Humano Criopreservado	Interleucina-6	Proposta original

WB: sangue total humano, cryo: criopreservado, IL: interleucina,

* sistemas farmacopeicos validados.

4.3.1 Preparo da curva de endotoxina

O padrão de endotoxina utilizado no ensaio de MAT foi o LPS de *E coli* sorotipo O55:B5 (Sigma, referência nº L2880, lote nº 032M4082V). Para a curva dose-resposta, o padrão na concentração de 1mg/mL foi agitado vigorosamente por 20 minutos antes de realizar as diluições da curva e utilizado imediatamente.

Foram realizadas diluições seriadas até atingir a concentração de 1 ng/ml que corresponde a 5 UE. A partir desta solução foram realizadas diluições de acordo com o quadro 5, para obtenção da curva de endotoxina com 0,25; 0,5; 1,0 e 2,5 UE/mL. As diluições e o controle negativo foram realizados com solução fisiológica de NaCl à 0,9 % apirogênica (Halex/Star lote nº 84795).

Quadro 5: Preparação da curva padrão de endotoxina

Endotoxina Estoque (UE/mL)	µL da solução de endotoxina estoque	µL de NaCl	Concentração de endotoxina no tubo (UE/mL)
500	100	9900	5 ¹
5	2000	2000	2,5
2,5	2000	3000	1
1	2000	2000	0,5
0,5	2000	2000	0,25

¹: Estas concentrações não foram utilizadas no ensaio

4.3.2 Cálculo da Máxima Diluição Válida

A máxima diluição válida (MDV) (do inglês *Maximum Valid Dilution, MVD*) da VFA foi calculada pela multiplicação da concentração limite de endotoxina (CLE) pela concentração do contaminante da solução teste (C) e dividida pelo limite de detecção (LD).

A bula da VFA preconiza como dose humana 3,75 unidades internacionais (UI) em 0,5 mL. Desta forma estes valores foram utilizados para fazer o cálculo do CLE. Visto que 5 UE/kg representa a dose máxima permitida capaz de gerar reação pirogênica em produtos injetáveis conforme a FE, foi possível calcular o MDV seguindo a fórmula abaixo.

A CLE foi calculada de acordo com o valor limite de endotoxina bacteriana preconizado pela monografia do produto na Farmacopeia Brasileira que é 10 UE/kg de peso corpo.

$$\text{MDV} = \frac{\text{CLE} \times \text{C (UI/mL)}}{\text{LD}}$$

Onde:

CLE: concentração limite de endotoxina.

C: concentração da solução teste (UI/mL), se o limite de endotoxina é especificado por unidade de atividade biológica

LD: limite de detecção (UE/mL)

O LD foi determinado pelos valores negativos do controle de endotoxina da curva padrão, que corresponde ao valor *cut-off* em UE. O cálculo do LD é definido pela média de quatro (4) controles negativos independentes, somado com três (3) vezes o desvio padrão (D.P.) desses valores.

4.3.3 Coleta do sangue total

A coleta do sangue total de doadores voluntários foi realizada por punção venosa, em tubos contendo heparina. Para compor a matriz do MAT, foram reunidos os sangues de pelo menos quatro doadores individuais. Assim, foi coletado o equivalente a 10 mL de cada doador que assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e preencheram questionários para uma triagem onde se declararam saudáveis, ausentes de infecções bacterianas e/ou virais no mínimo há uma semana. Os doadores também declararam não ter tomado medicamentos anti-inflamatórios não-esteróides há 48 horas antes da coleta de sangue e anti-inflamatórios esteróides durante os 7 dias anteriores a coleta.

O projeto está licenciado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) da Fiocruz, sob o número 368/07.

4.3.3.1 *Contagem das células sanguíneas*

Uma parte do sangue fresco de cada doador foi separada para a contagem diferencial de células sanguíneas utilizando o contador Hemogram 60 BioClin®, sendo discriminado tipos celulares como leucócitos totais, linfócitos totais e percentuais e granulócitos, sendo estes alguns dos itens avaliados para excluir possíveis doadores fora dos parâmetros especificados pelo fabricante do aparelho. Este procedimento foi adotado em dois ciclos de coleta de doadores, realizados com intervalo de aproximadamente 2 meses, utilizando doadores distintos com pelo menos 4 doadores em cada ciclo. Os mesmos doadores foram utilizados para os ensaios de sangue fresco e criopreservado.

4.3.3.2 *Preparo sangue fresco*

Parte do sangue coletado e analisado foi utilizada para preparar o contato com sangue fresco. Este procedimento foi feito antes de completar 4 horas da coleta. A matriz do MAT foi composta pelo sangue total de 4 doadores.

4.3.3.3 *Preparo sangue criopreservado*

Após a coleta do sangue, o procedimento de criopreservação foi realizado com uma parte do sangue coletado, seguindo o protocolo de Schindler e colaboradores (2006). A solução de criopreservação foi realizada pela mistura de 7 mL de sangue e 7 mL da solução de dimetilsulfóxido (Wak Chemie Medical GmbH, Steinbach, Germany) com tampão Sorensen 20% (v/v) (Acila AG, Mörfelden

Walldorf, Germany). O sangue foi criopreservado individualmente em alíquotas de 0,6 mL em microtubos de 1,8 mL, sendo estocados em freezer a -80°C em caixas para criopreservação por um período até 4 meses. Todo o procedimento foi realizado sob fluxo laminar.

4.3.4 Preparo das amostras para teste de interferentes

De modo a testar a interferência da VFA frente a atividade dos monócitos, as amostras foram diluídas a partir da VFA reconstituída em 5 mL de solução de NaCl à 0,9% apirogênica. A partir do cálculo de MDV foram realizadas diluições seriadas com solução de NaCl à 0,9% (v/v).

Para o contato com o sangue, foram adicionados 450 μL de NaCl à 0,9%; 50 μL de cada amostra diluída com e sem LPS e 100 μL de sangue criopreservado em microtubos apirogênicos identificados. Para obter uma concentração final igual a 0,5 EU/mL na VFA, foram adicionados 250 μL de LPS a 5 UE/mL em 2250 μL correspondente a cada diluição da vacina.

Após essa etapa, os microtubos foram incubados em uma estufa à 37°C (5% CO_2), por aproximadamente 16 horas.

As diluições com recuperação de endotoxina dentro do intervalo de 50-200% foram consideradas livres de interferências e a primeira diluição com percentual de recuperação (rec %) em torno de 100% foi definida como a diluição mínima válida (MinDV). Os dados foram expressos pela média de 4 repetições.

4.3.5 Contato da vacina febre amarela com sangue fresco

A VFA foi reconstituída foi diluída com solução de NaCl à 0,9% de acordo com a diluição adequada para o ensaio obtida a partir dos resultados do teste de interferência.

Para o contato com o sangue, foram adicionados 500 μL de NaCl à 0,9%; 50 μL de cada amostra diluída com e sem LPS e 50 μL de sangue fresco em

microtubos apirogênicos identificados. Para amostras contaminadas propositalmente com LPS exógeno, foram adicionados 5 µL de LPS a 5 UE/ mL em 45 µL de amostra da VFA previamente diluída, para obter uma concentração final igual a 0,5 UE/mL. O preparo das amostras se encontra resumido no quadro 6.

Em cada ensaio a curva de LPS nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 5,0 UE/mL de NaCl foi realizada em paralelo para validação de cada ensaio.

Após essa etapa, os microtubos foram colocados abertos em estante apropriada e cobertos com papel alumínio, em seguida foram incubados em uma estufa à 37°C (5% CO₂), por aproximadamente 16 horas.

Quadro 6: Contato da VFA com sangue fresco em microtubos.

Componentes do contato	Não contaminada	Contaminada (0,5 UE/mL)
	µL/microtubo	
VFA diluída	50	50
NaCl 0.9%	500	500
Sangue fresco	50	50
Total	600	600

Após o período de incubação, os microtubos foram fechados e homogeneizados vigorosamente por inversão, centrifugados a 1500 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi separado e analisado imediatamente ou congelado até o momento da análise.

4.3.6 Contato da vacina febre amarela com sangue criopreservado

Na preparação do contato com sangue criopreservado, o mesmo foi retirado do freezer a - 80°C e descongelado em estufa a 37 °C durante 15 minutos. Após descongelamento, o sangue de diferentes doadores foi reunido para formar a matriz do ensaio.

A VFA foi reconstituída com 5 mL de solução de NaCl à 0,9% apirogênica, conforme instruções do produtor. Posteriormente, a VFA foi diluída com solução de NaCl à 0,9% de acordo com a diluição adequada para o ensaio obtida a partir dos resultados do teste de interferência.

Para o contato com o sangue, foram adicionados foram adicionados 450 μ L de NaCl à 0,9%; 50 μ L de cada amostra diluída com e sem LPS e 100 μ L de sangue fresco em microtubos apirogênicos identificados. Para amostras contaminadas propositalmente com LPS exógeno, foram adicionados 5 μ L de LPS a 5 UE/ mL em 45 μ L de amostra da VFA previamente diluída, para obter uma concentração final igual a 0,5 UE/mL. O preparo das amostras se encontra resumido no quadro 7.

Quadro 7: Contato da VFA com sangue criopresevado em microtubos.

Componentes do contato	Não contaminada	Contaminada (0,5 UE/mL)
	μ L/microtubo	
VFA diluída	50	50
NaCl 0,9%	450	450
Sangue fresco	100	100
Total	600	600

Após o período de incubação, os microtubos foram fechados e homogeneizados vigorosamente por inversão e analisadas imediatamente ou congeladas até o momento da análise.

4.3.7 Dosagem de citocinas IL-1 β e IL-6

Para a determinação da liberação das citocinas IL-1 β e IL-6 no sangue humano, foram utilizados os kits comerciais da R&D Systems. Para a determinação de IL-1 β foi utilizado o kit *Human IL-1beta/IL-1F2 quantikine ELISA* com

sensibilidade 3,9 a 250 pg/mL e para IL-6, o kit *Human IL-6 quantikine ELISA*, com sensibilidade de 3,12 - 300 pg/mL.

4.3.7.1 Preparo da curva-padrão de citocinas

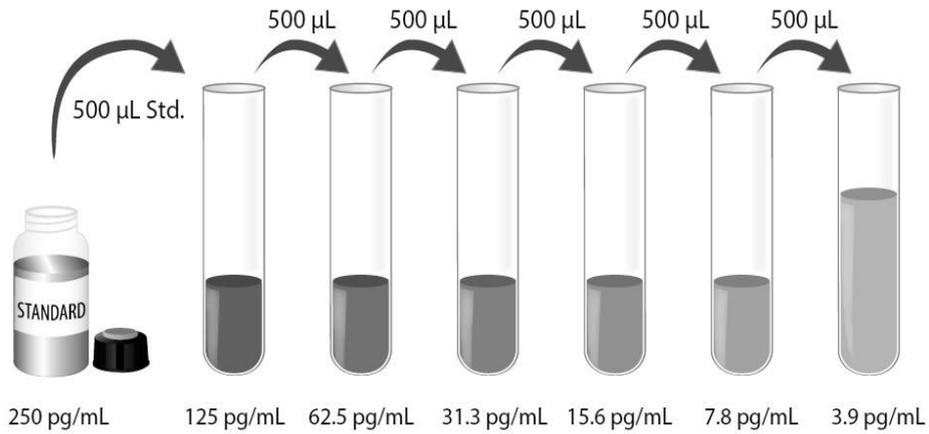
As curvas-padrão de citocinas foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante e ilustradas na figura 8.

Para a curva padrão de IL-1 β , o padrão foi reconstituído com 5 mL do diluente RD6C para obter uma concentração de 250 pg/mL. Foram adicionados 500 μ L do diluente do ensaio em seis tubos referentes às concentrações de 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8 e 3,9 pg/mL. Após a reconstituição do padrão na concentração de 250 pg/mL, 500 μ L desta solução foram transferidos para o tubo referente a 125 pg/mL e realizada diluição seriada até obter uma concentração de 3,9 pg/mL (Figura 7).

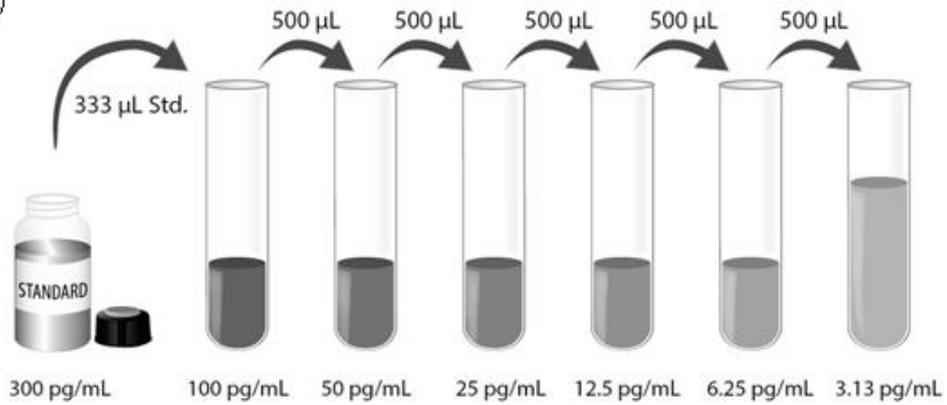
Para a curva padrão de IL-6, o padrão foi reconstituído com 5 mL do diluente RD6F para obter uma concentração de 300 pg/mL. Foram adicionados 667 μ L do diluente do ensaio para o tubo correspondente a 100 pg/mL e 500 μ L para os 5 tubos referentes às concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,13 pg/mL. Após a reconstituição do padrão na concentração de 300 pg/mL, 333 μ L desta solução foram transferidos para o tubo referente a 100 pg/mL e realizada diluição seriada até obter uma concentração de 3,13 pg/mL (Figura 7).

Figura 8: Esquema de diluição das citocinas, conforme recomendação do fabricante (A) IL-1 β e (B) IL-6.

(A)



(B)



Fonte: Manual kits da R&D Systems

4.3.7.2 *Preparo da placa de ELISA*

As placas de ELISA foram preparadas adicionando aos poços: 50 μ L (IL-1 β) e 100 μ L (IL-6) do diluente do ensaio em todos os poços da placa do kit; 200 μ L (IL-1 β) e 100 μ L (IL-6) das soluções referentes ao padrão de citocinas (duplica), curva de LPS, amostras da VFA com e sem adição de LPS 0,5 UE/mL e controle negativo (quadruplicata). As placas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Após esse período, o conteúdo foi desprezado, aspirado e lavado por 3 vezes (IL-1 β) e 4 vezes (IL-6) com 400 μ L do tampão de lavagem. Após o procedimento de lavagem, foram adicionados 200 μ L do conjugado correspondente. As placas foram incubadas por mais 2 horas e lavadas conforme procedimento descrito acima. O volume de 200 μ L do substrato foi adicionado aos poços e a placa incubada por mais 20 minutos protegida da luz. Após este período, foram adicionados 50 μ L da solução de parada (Figura 9).

Figura 9: Distribuição na placa de ELISA (azul claro). Em cinza claro: curva padrão (STD, *standard*); cinza escuro: controle negativo (CN) e curva de LPS; amarelo: VFA: vacina contra febre amarela (VFA); laranja: vacina contra febre amarela adicionada de 0,5UE/mL

	1	2	3	4	4	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	CN	2	4	VFA						
B	STD 1	STD1	CN	2	4	VFA						
C	STD2	STD2	CN	2	4	VFA						
D	STD3	STD3	CN	2	4	VFA						
E	STD4	STD4	1	3	5	VFA						
F	STD 5	STD 5	1	3	5	VFA						
G	STD 6	STD 6	1	3	5	VFA						
H	STD 7	STD 7	1	3	5	VFA						

4.4 TESTE QUANTITATIVO DE ENDOTOXINA

O método utilizado para determinação do endotoxinas na VFA foi o método quantitativo A (Quadro 8), do MAT (FE, 2010), que envolve a comparação entre a preparação examinada e a curva dose-resposta do padrão de endotoxina

O método A, foi baseado na construção de uma curva concentração-resposta de LPS (O55:B5) diluído em NaCl 0,9% na faixa de 0,25 a 2,5 EU/mL como controle positivo do teste.

Como controle do ensaio, amostras da VFA foram contaminadas propositalmente com LPS exógeno de modo a determinar a taxa de recuperação no sistema. A taxa de recuperação nas amostras da VFA foi calculada como

porcentagem do valor teórico com concentração da endotoxina de 0,5 UE/mL, correspondente a 100%, sendo o cálculo de recuperação analisado pela subtração dos valores obtidos no controle da VFA sem adição da endotoxina. Assim, para o ensaio ser válido, foram considerados aqueles lotes em que o LPS adicionado foi recuperado dentro do intervalo de 50-200%.

Os lotes da VFA foram considerados livres de endotoxinas bacterianas, quando a concentração do contaminante na VFA foi menor que o CLE, sendo o valor de 0,5 UE/mL determinado como *cut-off* do teste. Estes valores foram determinados pela quantidade de citocinas liberadas em resposta à concentração 0,5 UE/mL da curva-padrão.

Quadro 8: Sumário do teste quantitativo de endotoxinas (Método A)

Solução	Endotoxina	Número de replicatas	Observação
VFA diluída	-	4	-
VFA diluída	0,5UE/mL	4	Controle de interferente da VFA
NaCl 0,9%	-	4	Controle negativo
NaCl 0,9%	4 concentrações de endotoxina padrão-	4	Curva de LPS

4.4.1 Cálculo da concentração de endotoxina

O cálculo da concentração de endotoxina foi realizado subtraindo a média das Densidades Ópticas (DO) do branco, da média das DO dos padrões, sendo estas determinadas pela leitura das amostras realizada em um espectrofotômetro de microplacas no equipamento de leitor de ELISA VersaMax da Molecular Devices. As leituras foram realizadas em um comprimento de onda de luz visível de 450nm com

correção de 540nm para 570nm. A concentração de endotoxina foi determinada através do cálculo de regressão linear. Todos os cálculos para determinação da média, o desvio padrão da curva de LPS, amostras e controle foram realizados utilizando a programação pré-definida do software SoftMax® Pro5.

4.4.2 Parâmetros de validação (ICCVAM, FE)

Os parâmetros de validação para o MAT, bem como, a verificação produto-específica foram realizadas seguindo as especificações do ICCVAM, sendo estas sumarizadas no quadro 9.

Quadro 9: Parâmetros e especificações dos resultados

Componentes do protocolo	Recomendações do ICCVAM		Adequação dissertação
Componentes do protocolo	Sangue total Criopreservado IL-1 β	Sangue total fresco IL-6	Sangue total criopreservado IL-6
Substância teste	Testar sem diluir e diluições seriadas para avaliar a interferência, MVD		
Número de doadores	Mínimo de 3 (independentes ou reunidos)		
Critério de decisão para interferência	Controle positivo entre 50% e 200% de 0,5 EU/mL		
Contato amostra/sangue	Curva, amostras e controles medidos em quadruplicada		
ELISA	Incluir 7 pontos da curva IL-1 β em duplicata	Incluir 7 pontos da curva IL-6 em duplicata	
Critério de aceitabilidade	Função quadrática de IL-1 β $\geq 0,95$	Função quadrática de IL-6 $\geq 0,95$	
Decisão de critério de pirogenicidade	Concentração de endotoxina da substância teste > concentração limite de endotoxina da substância teste		

Fonte: ICCVAM, 2008

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA UTILIZADA NO MAT

Para análise da curva dose-resposta do LPS no MAT foi utilizado o programa estatístico Excel® v.5. Este programa utilizou o Teste F de Fisher e o valor de p para avaliar uma possível diferença estatisticamente significativa entre os pontos da curva dose-resposta separados em intervalos não pirogênicos (controle negativo até a dose de 2,5 UE/mL) e pirogênicos (0,5 UE até 2,5 UE/mL). O coeficiente de determinação (r^2) foi utilizado para avaliar estatisticamente a linearidade da curva,

inclinações de cada intervalo em relação a zero (curva teórica, onde não há inclinação). Assim, $p > 0,05$ significou que a inclinação não foi estatisticamente diferente de zero e $p < 0,05$, considerou-se que houve a diferença. Para a comparação destes coeficientes foi utilizado o Test T de Fisher, descrito por KENNY (1986), onde os valores r foram transformados para Z para uma normalização dos dados (\log_{10}). Neste caso, $p < 0,05$ foi utilizado para demonstrar a diferença estatisticamente significativa entre os dois coeficientes.

Existem dois critérios de aceitação para a curva padrão, (1) a regressão das respostas deve ser estatisticamente significativa ($p < 0,01$), (2) a regressão das respostas, em escala logarítmica não devem desviar significativamente da linearidade ($p > 0,05$). Os valores da curva padrão observados no resultado do ensaio não devem desviar significativamente dos valores da curva padrão teórica.

Para determinar o grau de relação entre duas variáveis, ou seja, entre as análises de citocinas e entre os métodos para determinação de endotoxina, LAL e MAT, foi realizada o cálculo pelo coeficiente de Pearson, também chamado de coeficiente de correlação. Este coeficiente expressa o grau de dependência entre as variáveis, sendo valores variando entre +1 e -1, onde os valores positivos mostram uma correlação entre as duas variáveis e negativos uma relação inversa.

5 RESULTADOS

5.1 TESTE DE ENSAIO DE ENDOTOXINA BACTERIANA

Lotes da VFA/10 doses foram avaliados previamente ao MAT, pelo teste quantitativo cinético-cromogênico de LAL. Todos os parâmetros para aceitação da validade do ensaio foram alcançados de modo satisfatório, sendo linearidade da curva-padrão (R-1 a -0,98), inclinação (-0,3 a -0,1), interseção (+2,5 a +3,5) e coeficientes de variação da curva-padrão e amostras (<10%), tornando o ensaio válido. Conforme demonstrado na tabela 1, todos os lotes da VFA apresentaram valores de endotoxinas abaixo dos limites aceitáveis (<5 UE/ mL).

Tabela 1

Análise de lotes da VFA/10 doses produzidas por Bio-Manguinhos pela técnica de LAL.

Amostras	Dosagem de endotoxina em UE/mL	% Recuperação ^a
A	< 0,0250	113
B	< 0,0250	125
C	< 0,0250	140
D	0,0643	68
E	0,1012	87
F	< 0,0250	61
G	< 0,0250	89
H	< 0,0250	103
I	0,1627	151
J	0,1603	150

^a A recuperação foi calculada a partir da média da leitura de 4 replicatas dos resultados de VFA contaminadas artificialmente com 5UE/mL de LPS (VFA+) e a mesma amostra não contaminada (VFA-) aplicando a seguinte fórmula: % de rec = (VFA(+) – VFA(-) x 100) / 5). Limite de sensibilidade de teste: 0,0250UE/mL.

5.2 QUALIFICAÇÃO DOS DOADORES DE SANGUE

A avaliação do sangue dos doadores foi realizada inicialmente pelo perfil hematológico, sendo os parâmetros analisados, a contagem de células brancas, linfócitos, células intermediárias e granulócitos, comparados com valores de referência calibrados pelo contador Hemogram.

Foram realizadas duas coletas de sangue em momentos diferentes, sendo os 4 primeiros reunidos para formar uma matriz única com diferentes doadores (matriz 1) e os 4 últimos reunidos conforme citado para formar uma segunda matriz com diferentes doadores (matriz 2). A matriz 1 foi utilizada para os ensaios com sangue criopreservado, enquanto, a matriz 2, foi utilizada para os ensaios comparativos entre sangue fresco e criopreservado.

De acordo com os dados da tabela 2, todos os doadores selecionados para formar a matriz monocítica estavam aptos para avaliação do ensaio de liberação de citocinas pelo MAT, conforme o resultado do perfil de análise dos componentes do sangue.

Tabela 2

Perfil hematológico dos doadores de sangue utilizados como matriz monocítica nos ensaios de MAT.

Matriz ^a	Doador	Elementos do sangue ^b			
		WBC#	LYM#	MID#	GRA#
1	1	5,37	1,50	0,55	3,32
	2	7,16	2,55	0,94	3,67
	3	9,44	2,03	1,00	6,37
	4	6,48	1,48	0,82	7,80
2	5	7,36	1,71	0,92	4,73
	6	8,40	2,31	1,49	4,60
	7	9,27	3,64	0,93	4,70
	8	3,92	1,57	0,71	1,64
Faixa referência (10 ⁹ /L)		4,00 -10,00	0,80 – 4,00	0,10 – 1,00	2,00 – 7,80

^aMatriz 1: Sangue de 4 doadores e Matriz 2: sangue de 4 outros doadores coletado após 2 meses para formar a matriz monocítica do MAT.

^bWBC#, contagem de célula branca; LYM#, contagem de linfócitos; MID#, contagem de células intermediárias; GRA#, contagem de granulócitos.

5.3 MÁXIMA DILUIÇÃO VÁLIDA PARA A VACINA CONTRA A FEBRE AMARELA

O cálculo do MVD foi realizado conforme descrito na FE. Para isto foram utilizados os valores da concentração limite de endotoxina (CLE) preconizados pela monografia da VFA presente na FB de 10 UI/dose humana e a concentração da solução teste (C) referenciada como a potência da VFA no valor de 3,75UI/mL. O LD foi definido a partir do resultado do branco do ensaio realizado em quadruplicata na matriz monocítica, sendo a concentração de endotoxina correspondente ao valor do *cut-off* (“background” do ensaio), que foi determinado como 0,045 para IL-1 β e 0,042 para IL-6.

De acordo com cálculo abaixo, fica estabelecida como a MDV da VFA para aplicação do ensaio MAT os valores 1/833 para a leitura de IL-1 β e 1/893 para IL-6.

CLE: concentração limite de endotoxina: 10 UE/mL

C: concentração da solução teste ou potência da solução teste: 3,75 log₁₀ UI/mL

LD IL-1 β: limite de detecção: 0,045

LD IL-6: limite de detecção: 0,042

$$\text{MDV}_{\text{VFA-IL1}} = \frac{\text{CLE} \times \text{C}}{\text{LD}} \quad \text{MDV}_{\text{VFA}} = \frac{10 \times 3,75}{0,045} = \frac{18,75}{0,045} = 833$$

$$\text{MDV}_{\text{VFA-IL6}} = \frac{\text{CLE} \times \text{C}}{\text{LD}} \quad \text{MDV}_{\text{VFA}} = \frac{10 \times 3,75}{0,042} = \frac{18,75}{0,042} = 893$$

5.4 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS EM SANGUE TOTAL CRIOPRESERVADO COM DETECÇÃO DE IL-1β

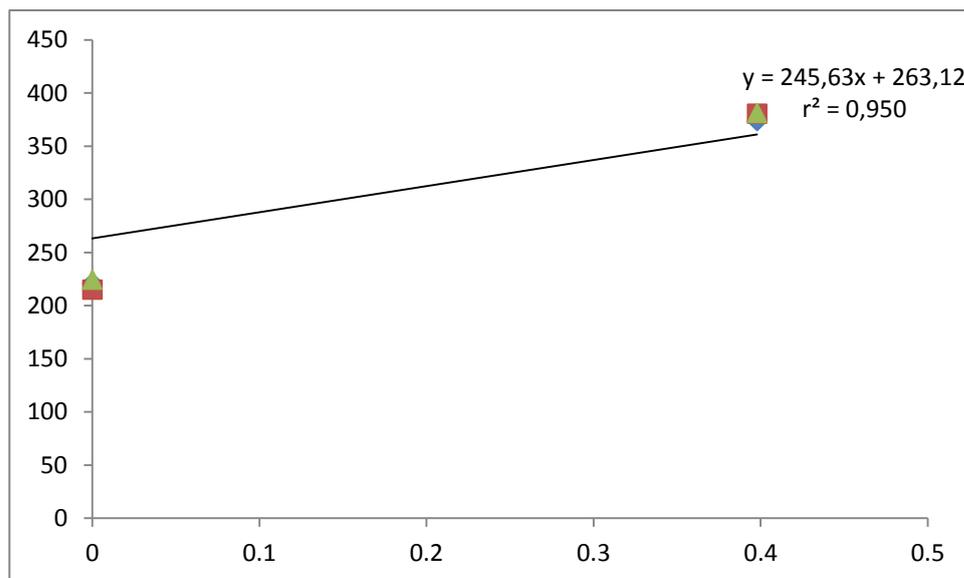
Neste capítulo serão apresentados dados referentes à detecção de IL-1β.

5.4.1. Qualificação das células provenientes do sangue criopreservado para o ensaio com IL-1β

Para avaliar o sangue dos doadores para o ensaio de MAT utilizando a detecção de IL-1β, as amostras de sangue de 4 doadores foram reunidas, para formar a matriz monocítica do ensaio (matriz 1), e qualificados de acordo com a FE. A matriz foi desafiada frente a uma curva padrão de LPS de *E.coli* nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0 e 2,5 UE/mL e o controle negativo. Os resultados demonstraram que o nível basal de liberação da citocina não interferiu na interpretação da curva dose-resposta e que esta apresentou valores de liberação de IL-1β dependente da concentração de LPS (Figura 10).

As interpretações foram baseadas nos parâmetros estatísticos preconizados pela FE, que prioriza a avaliação de 2 critérios para validar a sangue. (1) regressão da resposta com valores de $p^1 < 0,01$ e (2) a relação linearidade e regressão da resposta não deve desviar significativamente, com valores de $p^2 > 0,05$. Todos os parâmetros para a aceitação da validade do ensaio foram alcançados de modo satisfatório, sendo a regressão da resposta com $p^1 = 0,004$ e a relação linear entre as concentrações e as respostas, confirmada pelo valor de $p^2 = 0,483$. Adicionalmente, o coeficiente de determinação (r^2) também foi utilizado para avaliar estatisticamente a linearidade da curva, apresentando valor de $r^2 = 0,950$ (Tabela 3, Figura 10).

Figura 10- Curva padrão de endotoxina em sangue criopreservado para a detecção de IL-1 β .



Eixo x: Log da dose de LPS, Eixo y: concentração de IL-1 β (pg/mL).

Tabela 3

Avaliação dos critérios de aceitação da matriz monocítica para a detecção de IL-1 β em sangue desafiado pela curva de LPS

Curva LPS		IL-1 β
UE/mL	Log dose	(pg/mL)
0	-	3,38
0,25	-0,60206	103,45
0,50	-0,30103	196,46
1,00	0	220,17
2,50	0,39794	378,30
r²	-	0,950
p¹	-	0,004
F	-	1,050
p²(F)	-	0,483

r²: coeficiente de determinação; p¹: p<0,01, p²: p<0,05 foi utilizado para demonstrar a diferença estatisticamente significativa entre os dois coeficientes. F: Teste T de Fisher.

5.4.2 Teste de fatores interferentes para IL-1 β

O teste de interferentes para VFA utilizando sangue criopreservado e detecção de IL-1 β como parâmetros de leitura foi realizado com 3 lotes da vacina estereis e apirogênicos, segundo critérios de aprovação do LAL descritos na monografia do produto na FB.

O teste de interferentes foi realizado com base no cálculo do MVD, sendo avaliados a VFA pura e suas diluições em progressão geométrica até a diluição de 1/320, mesmo sendo permitido sua diluição até 1/833. A recuperação de LPS dentro da faixa preconizada para o ensaio, entre 50-200%, ocorreu em todas as diluições, inclusive na amostra sem diluir. A média de recuperação de LPS entre as diluições da VFA foi de 104,2%.

Com base nos resultados foi estabelecida a diluição de 1/10 como a diluição mínima válida (MinDV) por representar a diluição a partir da qual o LPS foi recuperado próxima da média e entorno de 100% para todas as leituras (Tabela 4, Figura 11).

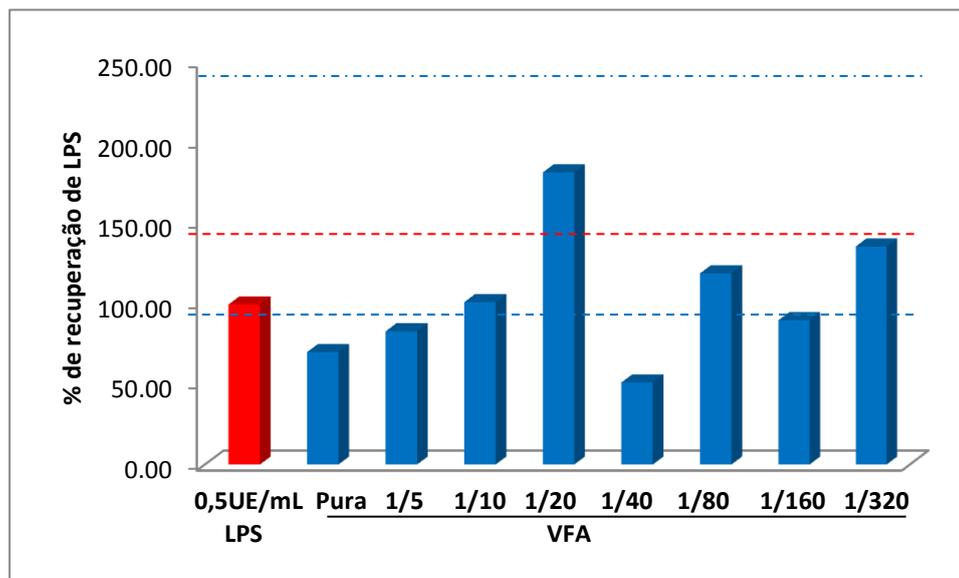
Tabela 4

Teste de interferentes para VFA no MAT utilizando sangue criopreservado com detecção de IL-1 β como parâmetros de leitura.

Teste de Interferentes	Concentração de IL-1 β (pg/mL)				Taxa recuperação de LPS (%) ^c	
	Amostras	Controle NaCl+ (<i>cut-off</i>)	Lote VFA- ^(a)	Lote VFA+ ^(b)		Diferença ^(b-a)
LPS		1964,58	-	-	-	100,0%
0,5 UE/mL						
Vacina Pura	-		481,47	1865,41	1383,94	70,4
Vacina 1/5	-		109,94	1749,18	1639,24	83,4
Vacina 1/10	-		<3,9	1991,36	1991,36	101,4
Vacina 1/20	-		<3,9	3567,54	3567,54	181,6
Vacina 1/40	-		22,24	1032,02	1009,78	51,4
Vacina 1/80	-		3,47	2345,44	2341,97	119,2
Vacina 1/160	-		29,16	1803,89	1774,73	90,3
Vacina 1/320	-		25,10	2692,66	2667,56	135,8
Média	-		83,90	2288,30	2047,00	104,2

^c A recuperação foi calculada a partir da média da leitura de 4 replicatas dos resultados de VFA contaminadas artificialmente com 0,5/UEmL de LPS (VFA+) e a mesma amostra não contaminada (VFA-) aplicando a seguinte fórmula: % de rec = (VFA(+) – VFA(-) x 100) / 0,5). Limite de sensibilidade de teste: 3,9 pg/mL. Limite aceitação de recuperação (50-200%).

Figura 11 - Teste de interferentes para VFA pura e diluída em 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 1/160 e 1/320 através da resposta da liberação de IL-1 β para o estímulo de 0,5 UE/mL de LPS de *E.coli* O55:B5 por ELISA em sangue criopreservado. Média de resultados em quadruplicata. A linha vermelha representa o corte na concentração de 0,5 UE/mL de LPS e as linhas azuis correspondem aos limites de aceitação (entre 50 e 200%).



5.4.3 Teste quantitativo utilizando o sistema MAT: sangue criopreservado/IL-1 β

Para avaliar a capacidade o MAT detectar quantitativamente o LPS pelo método A (de acordo com a FE, 2.6.30), 10 lotes da VFA foram diluídos 1/10 após reconstituição da vacina e avaliados (1) a presença da endotoxina na amostra e (2) percentual de recuperação de LPS (0,5 UE/ mL) nas amostras contaminadas com endotoxina exógena, sendo este um dos critérios de aceitação interno do teste. Estes parâmetros foram comparados com uma curva dose-resposta de endotoxina padrão analisadas em paralelo.

Os resultados da concentração de IL-1 β são equivalentes a uma média de 4 repetições de cada lote, todos obtidos a partir de uma matriz formada pelo sangue de 4 doadores. Todos os lotes analisados foram negativos para a presença de LPS,

porém no critério de recuperação do LPS exógeno, apenas o lote J se encontrou fora das especificações com recuperação de 360,3% (Tabela 5). Este foi excluído para o cálculo da média de recuperação de endotoxina, que apresentou um valor de 0,68 UE/mL em amostras contaminadas com 0,5 UE/mL de LPS.

Tabela 5

Avaliação de endotoxina na VFA pelo método quantitativo A no MAT utilizando sangue criopreservado com detecção de IL-1 β .						
Amostras	Concentração de IL-1 β (pg/mL)			Diferença (b-a)	Taxa recuperação ^c	Recuperação UE/mL
	NaCl+ (cut-off)	Lote VFA- ^(a)	Lote VFA+ (b)			
LPS 0,5 UE/mL	278,51	-	-	-	100	0,50
Lotes VFA						
A		<3,9	305,58	305,58	109,7	0,55
B		<3,9	369,47	369,47	132,6	0,66
C		<3,9	413,93	413,93	148,6	0,74
D		<3,9	327,33	327,33	117,5	0,59
E		<3,9	415,67	415,67	149,2	0,75
F		<3,9	302,59	302,59	108,6	0,54
G		<3,9	407,05	407,05	146,1	0,73
LPS 0,5 UE/mL	174,31	-	-	-	100	0,50
Lotes VFA						
H		<3,9	255,25	255,25	146,4	0,73
I		<3,9	290,59	290,59	166,7	0,83
J		<3,9	628,03	628,03	360,3 ^F	1,80 ^F
Média^d		-	-	-	136,16	0,68

^c A recuperação foi calculada a partir da média da leitura de 4 replicatas dos resultados de VFA contaminadas artificialmente com 0,5/UEmL (VFA+) e a mesma amostra não contaminada (VFA-) aplicando a seguinte fórmula: % de recuperação (VFA(+) – VFA(-) x 100) / 0,5). Os valores de endotoxina recuperada foi aplicada pela diferença VFA (b-a) x 0,5 / pelo valor da leitura do ponto da curva 0,5 UE/mL. ^F: falha nos parâmetros de aceitação. Limite de sensibilidade de teste: 3,9 pg/mL. Limite aceitação de recuperação (50-200%).

^d Para o cálculo foram excluídos os dados do lote J, que estava fora dos parâmetros de aceitação.

5.4.4 Análise intra-ensaios (IL-1 β)

A análise intra-ensaios foi avaliada para determinar a confiabilidade dos ensaios que são assegurados pela determinação do CV – que corresponde à variação nos valores obtidos na dosagem das amostras na mesma placa realizadas em quadruplicada. Assim, foram avaliados os componentes de variância das concentrações de IL-1 β liberadas pelo estímulo com 0,5 UE/mL de LPS.

Conforme demonstrado na Tabela 6, foi possível observar um perfil similar de CV entre os lotes da VFA e comparado com o controle de LPS (<20%), sendo este considerado o padrão de referência interno do ensaio (Tabela 6). Os CVs do LPS e dos lotes da VFA apresentaram resultados dentro dos limites descritos na literatura (Hasiwa et al, 2013) e estipulada como adequada para ensaios biológicos segunda a OMS (1997).

Tabela 6

Análise intra-ensaios de lotes da VFA no MAT utilizando sangue criopreservado com detecção de IL-1 β como parâmetros de leitura.

Amostras	Concentração de IL-1 β (pg/mL)				
	Controle NaCl+	Lote VFA+ ^a	Média	Desvio	CV
LPS 0,5 UE/mL	256,76	-	278,51	48,84	17,5
	347,68				
	274,49				
	235,13				
Lotes VFA A	-	332,24	305,58	19,3	6,3
		287,92			
		295,84			
		306,32			
B	-	382,87	369,47	53,88	14,6
		436,46			
		349,43			
		309,14			
C	-	431,49	413,92	37,76	9,1
		357,49			
		429,47			
		437,26			

^a Resposta da liberação de IL-1 β para o estímulo de 0,5 UE/mL derivada do LPS de *E.coli* O55:B5 por ELISA em sangue criopreservado de matriz monocítica formada por 4 doadores.

5.4.5 Análise inter-ensaio (IL-1 β)

A análise inter-ensaio foi avaliada para determinar a confiabilidade dos ensaios que são assegurados pela determinação do CV – que corresponde a variação nos valores obtidos na dosagem das amostras em placa realizadas em dias diferentes. Assim, foram avaliados os componentes de variância das concentrações de IL-1 β liberadas pelo estímulo com 0,5 UE/mL de LPS.

Conforme demonstrado na Tabela 7 foi possível observar um perfil similar de CV entre os controles de LPS em dias diferentes, sendo este considerado o padrão de referência interno do ensaio (Tabela 7). A análise do lote de VFA apresentou valores de CV similares ao do LPS e apresentaram resultados dentro dos limites descritos na literatura (<20%) (Hasiwa et al, 2013) e estipulada como adequada para ensaios biológicos segundo o OMS (1997).

Tabela 7

Análise inter-ensaio de lotes da VFA no MAT utilizando sangue criopreservado com detecção de IL-1 β .

Amostras	Dia 1		Dia 2	
	IL-1 β (pg/mL) ^a	%	IL-1 β (pg/mL) ^a	%
	Replicata	Recuperação ^b	Replicata	Recuperação ^b
LPS	256,76	100,0	149,53	100,0
	347,68		178,80	
	274,49		166,51	
	235,13		202,40	
Média	278,51	-	174,31	-
Desvio	48,83	-	22,24	-
CV	17,53	-	12,75	-
Lote A	332,24	109,7	349,57	167,0
	287,92		261,08	
	295,84		311,33	
	306,32		240,37	
Média	305,58	-	290,59	-
Desvio	19,30	-	49,33	-
CV	6,32	-	19,97	-

^a Resposta da liberação de IL-1 β para o estímulo de 0,5 UE/ mL derivada do LPS de *E.coli* O55:B5 por ELISA em sangue criopreservado com *pool* de 4 doadores.

^b A recuperação foi calculada a partir da média da leitura de 4 replicatas dos resultados de VFA contaminadas artificialmente com 0,5/UEmL (VFA+) e a mesma amostra não contaminada (VFA-) aplicando a seguinte fórmula: % de recuperação (VFA(+) – VFA(-) x 100) / 0,5). Os valores de endotoxina recuperada foi aplicada pela diferença VFAx 0,5 / pelo valor da leitura do ponto da curva 0,5 UE/mL.

5.5 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS EM SANGUE TOTAL CRIOPRESERVADO COM DETECÇÃO DE IL-6

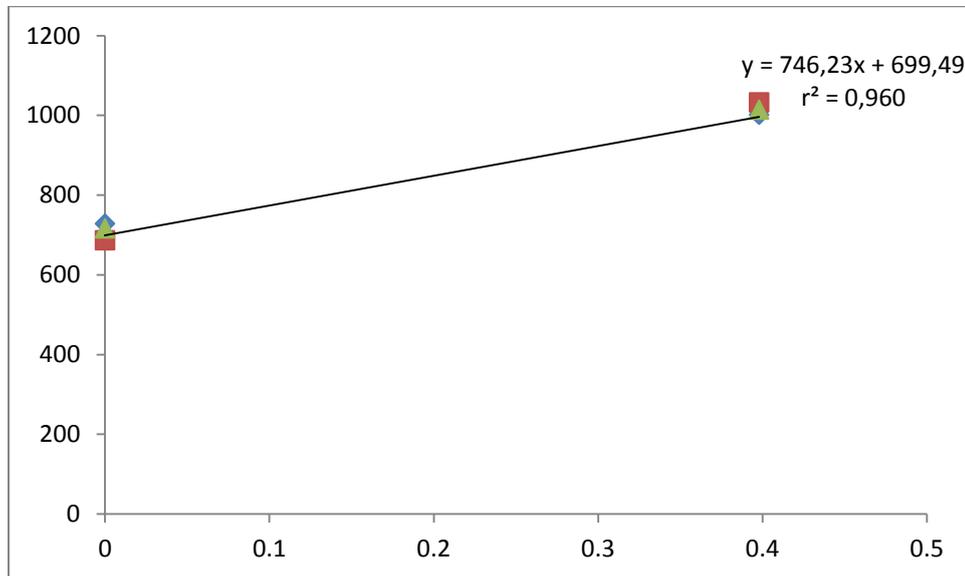
Neste capítulo serão apresentados dados referentes à detecção de IL-6 em sangue total criopreservado.

5.5.1 Qualificação das células provenientes do sangue criopreservado para o ensaio com IL-6

Para avaliar o sangue dos doadores para o ensaio de MAT utilizando a detecção de IL-6, o sangue de 4 doadores foi reunido, para formar a matriz monocítica do ensaio (matriz 1), e qualificados de acordo com a FE. A matriz foi desafiada frente a uma curva padrão de LPS de *E.coli* nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0 e 2,5 UE/mL e o controle negativo. Os resultados demonstraram que o nível basal de liberação da citocina não interferiu na interpretação da curva dose-resposta e que esta apresentou valores a liberação de IL-6 dependente da concentração de LPS (Figura 12).

As interpretações foram baseadas nos parâmetros estatísticos preconizados pela FE, que prioriza a avaliação de 2 critérios para validar a sangue. (1) regressão da resposta com valores de $p^1 < 0,01$ e (2) a relação linearidade e regressão da resposta não deve desviar significativamente, com valores de $p^2 > 0,05$. Todos os parâmetros para a aceitação da validade do ensaio foram alcançados de modo satisfatório, sendo a regressão da resposta com $p^1 = 0,004$ e a relação linear entre as concentrações e as respostas confirmada pelo valor de $p^2 = 0,478$. Adicionalmente, o coeficiente de determinação (r^2) também foi utilizado para avaliar estatisticamente a linearidade da curva, apresentando valor de $r^2 = 0,960$ (Tabela 8, Figura 12).

Figura 12 - Curva padrão de endotoxina em sangue criopreservado para a detecção de IL-6.



Eixo x: Log da dose de LPS; Eixo y: concentração de IL-6 (pg/mL).

Tabela 8

Avaliação dos critérios de aceitação da matriz monocítica para a detecção de IL-6 em sangue criopreservado desafiado pela curva de LPS.

Curva LPS		IL-6 (pg/mL)
UE/mL	Log dose	
0	-	<3,12
0,25	-0,60206	295,09
0,50	-0,30103	382,03
1,00	0	710,65
2,50	0,39794	1016,00
r^2	-	0,960
p^1	-	0,004
F	-	1,069
$p^2(F)$	-	0,478

r^2 : coeficiente de determinação; p^1 : $p < 0,01$, p^2 : $p < 0,05$ foi utilizado para demonstrar a diferença estatisticamente significativa entre os dois coeficientes. F: Teste T de Fisher.

5.5.2 Teste de fatores interferentes para IL-6

O teste de interferentes para VFA utilizando sangue criopreservado e detecção de IL-6 como parâmetros de leitura foi realizado com 3 lotes da vacina estereis e apirogênicas, segundo critérios de aprovação do LAL descritos na monografia do produto na FB.

O teste de interferentes foi realizado com base no cálculo do MVD, sendo avaliados a VFA pura e suas diluições em progressão geométrica até a diluição de 1/320, mesmo sendo permitindo sua diluição até 1/893.

A recuperação de LPS dentro da faixa preconizada para o ensaio, entre 50-200%, ocorreu na amostra sem diluir e na maioria das diluições, exceto na diluição 1/160 onde foi recuperado 202,7%. A média de recuperação de LPS entre as diluições da VFA foi de 137,2% chegando a 127,9% excluído o valor fora da especificação encontrado na diluição 1/160 (Tabela 9, Figura 13).

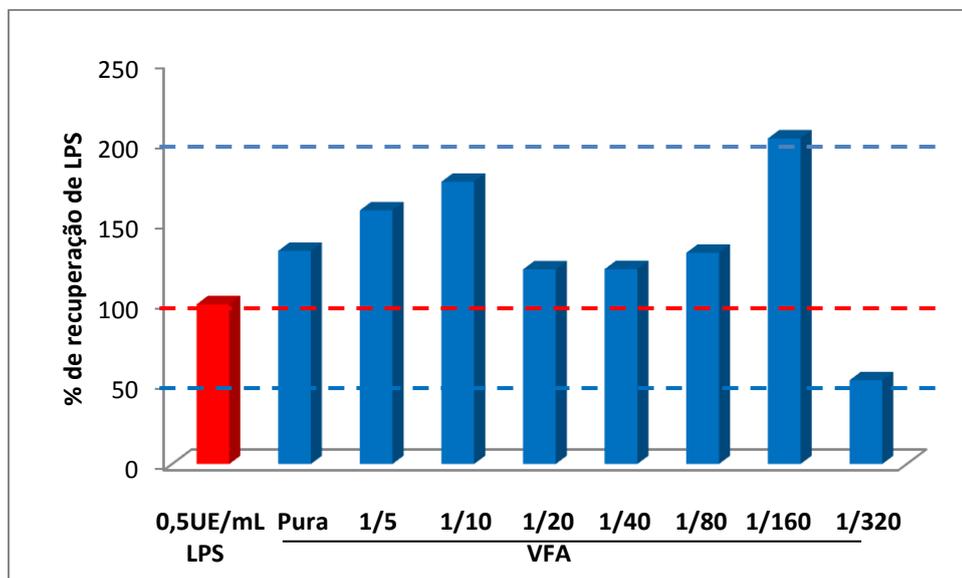
Tabela 9

Recuperação de endotoxina (%) obtida no teste interferente para VFA no MAT utilizando sangue criopreservado com detecção de IL-6 como parâmetros de leitura.

Teste de Interferentes	Concentração de IL-6 (pg/mL)				Taxa recuperação (%) ^c
	Amostras	Controle NaCl+ (<i>cut-off</i>)	Lote VFA- (a)	Lote VFA+ (b)	
LPS 0,5 UE/mL	382,03	-	-	-	100,0
Vacina Pura	-	64,7	573,3	508,6	133,1
Vacina 1/5	-	<3,12	604,2	604,2	158,2
Vacina 1/10	-	<3,12	672,3	672,3	175,9
Vacina 1/20	-	<3,12	464,9	464,9	121,6
Vacina 1/40	-	<3,12	465,5	465,5	121,8
Vacina 1/80	-	<3,12	503,9	503,9	131,9
Vacina 1/160	-	<3,12	774,3	774,3	202,7 ^F
Vacina 1/320	-	<3,12	201,0	201,0	52,6
Média	-	8,1	532,4	524,3	137,2

^cA recuperação foi calculada a partir da média da leitura de 4 replicatas dos resultados de VFA contaminadas artificialmente com 0,5/UEmL de LPS (VFA+) e a mesma amostra não contaminada (VFA-) aplicando a seguinte fórmula: % de rec = (VFA(+) – VFA(-) x 100) / 0,5). Limite de sensibilidade de teste: 3,9 pg/mL. Limite aceitação de recuperação (50-200%). ^F: falha nos parâmetros de aceitação.

Figura 13 -Teste de interferentes para VFA pura e diluída em 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 1/160 e 1/320 através da resposta da liberação de IL-6 para o estímulo de 0,5 UE/mL de LPS de *E.coli* O55:B5 por ELISA em sangue criopreservado. Foi utilizado matriz do sangue criopreservado composta por 4 doadores. Média de resultados em quadruplicata. A linha vermelha representa o corte na concentração de 0,5 UE/mL de LPS, dose limite que corresponde a febre em humanos e coelhos e as linhas azuis correspondem aos limites de aceitação (entre 50 e 200%).



Diferente do observado para a MinDV para IL-1 β , a diluição 1/10 na liberação de IL-6 não apresentou recuperação em torno de 100%, apesar de apresentar recuperação dentro dos parâmetros aceitáveis de recuperação de LPS para o teste de interferentes. De acordo com os valores de recuperação, 1/10 neste ensaio apresentou recuperação de 175,9 enquanto 1/20 e 1/40 apresentaram recuperações de aproximadamente 121% (Tabela 9).

Assim, com o intuito de comparar a resposta das citocinas provenientes do mesmo contato, o perfil de liberação de citocinas em VFA diluídas 1/10 (padrão utilizado na leitura de IL-1 β) foi comparado com o perfil de diluição 1/40 (diluição de recuperação em torno de 100%).

De acordo com estes resultados, foi confirmado que tanto a diluição 1/10

como 1/40 apresentaram a média de recuperação do endotoxina exógena dentro da faixa de recuperação com 99% e 112% para 1/10 e 1/40, respectivamente (Tabela 10). Assim, foi mantida a diluição 1/10 da VFA nos ensaios de MAT para testar a liberação de IL-6 e comparar com os resultados obtidos na liberação de IL-1 β proveniente dos mesmos contatos.

Tabela 10

Análise comparativa da diluição da VFA para a recuperação de endotoxina (%) obtida no teste interferente no MAT utilizando sangue criopreservado com detecção de IL-6 como parâmetros de leitura.

Amostra	Diluição	Concentração de IL-6 (pg/mL)			Diferença (b-a)	Taxa recuperação ^c	Recuperação UE/mL
		Controle NaCl+ (cut-off)	Lote VFA- (a)	Lote VFA+ (b)			
LPS	0,5UE/mL	17,774				100	0,50
Lotes VFA							
A	1/10		<3,12	13,3	13,30	73,87	0,34
B	1/10		<3,12	19,81	19,81	111,44	0,56
C	1/10		<3,12	19,89	19,89	111,90	0,56
Média			-	-	-	99,07	0,49
Lotes VFA							
A	1/40		<3,12	23,89	23,89	134,45	0,67
B	1/40		<3,12	16,232	16,23	91,32	0,45
C	1/40		<3,12	0,756	0,75	nd	nd
Média			-	-	-	112,88	0,56

^cA recuperação foi calculada a partir da leitura de 4 replicatas dos resultados de VFA contaminadas artificialmente com 0,5 UE/mL (VFA+) e a mesma amostra não contaminada (VFA-) aplicando a seguinte fórmula: % de recuperação = (VFA(+) – VFA(-) x 100) / 0,5). Limite aceitação para recuperação (50-200%). Limite de sensibilidade de teste: 3,12 pg/mL.

5.5.3 Teste quantitativo utilizando o sistema MAT: sangue criopreservado/IL-6

Para avaliar a capacidade de o MAT detectar quantitativamente o LPS pelo método A (de acordo com a FE, 2.6.30), 10 lotes da VFA foram diluídos 1/10 após reconstituição da vacina e avaliados (1) a presença da endotoxina na amostra e (2)

percentual de recuperação de LPS (0,5 UE/ mL) nas amostras contaminadas com endotoxina exógena, sendo este um dos critérios de aceitação interno do teste. Estes parâmetros foram comparados com uma curva dose-resposta de endotoxina padrão analisadas em paralelo.

Os resultados da concentração de IL-6 são equivalentes a uma média de 4 repetições de cada lote, todos obtidos a partir de uma matriz formada pelo sangue de 4 doadores. Todos os lotes analisados foram negativos para a presença de LPS, porém no critério de recuperação do LPS exógeno, apenas o lote J se encontrou fora das especificações com recuperação de 321,8% (Tabela 11). Este foi excluído para o cálculo da média de recuperação de endotoxina que foi em torno de 0,72 UE/mL em amostras contaminadas com 0,5 UE/mL de LPS.

Tabela 11

Recuperação de endotoxina (%) obtida em 10 lotes de para VFA no MAT utilizando sangue criopreservado com detecção de IL-6 como parâmetros de leitura.

Amostras	Concentração de IL-6 (pg/mL)				Taxa recuperação	Recuperação UE/mL
	Controle NaCl+ (<i>cut-off</i>)	Lote VFA-	Lote VFA +	Diferença (^a)		
LPS 0,5 UE/mL	170,76	-	-	-	100	0,50
Lotes VFA						
A		<3,12	304,55	304,55	178,3	0,89
B		<3,12	341,02	341,02	199,7	0,99
C		<3,12	336,04	336,04	196,8	0,98
D		<3,12	123,45	123,45	72,3	0,36
E		<3,12	302,32	302,32	177,0	0,88
F		<3,12	136,26	136,26	79,8	0,39
G		<3,12	282,79	282,79	165,6	0,83
LPS 0,5 UE/mL	26,24	-	-	-	100	0,50
H		<3,12	18,63	18,63	71,0	0,35
I		<3,12	45,11	45,11	172,0	0,86
J		<3,12	84,43	84,43	321,8 ^F	1,60 ^F
Média^d		-	-	-	145,83	0,72

^a A recuperação foi calculada a partir da média da leitura de 4 replicatas dos resultados de VFA contaminadas artificialmente com 0,5/UEmL (VFA+) e a mesma amostra não contaminada (VFA-) aplicando a seguinte fórmula: % de recuperação (VFA(+) – VFA(-) x 100) / 0,5). Os valores de endotoxina recuperada foi aplicada pela diferença VFA (b-a) x 0,5 / pelo valor da leitura do ponto da curva 0,5 UE/mL. ^F: falha nos parâmetros de aceitação. Limite aceitação de recuperação (50-200%). Limite de sensibilidade de teste: 3,12 pg/mL. ^d Para o cálculo foram excluídos os dados do lote J, que estava fora dos parâmetro de aceitação.

5.5.4 Análise intra - ensaio (IL-6)

A análise intra-ensaio foi avaliada para determinar a confiabilidade dos ensaios que são assegurados pela determinação do CV – que corresponde a variação nos valores obtidos na dosagem das amostras na mesma placa realizadas

em quadruplicada. Assim, foram avaliados os componentes de variância das concentrações de IL-6 liberadas pelo estímulo com 0,5 UE/mL de LPS.

Conforme demonstrado na Tabela 12, foi possível observar um perfil similar de CV entre os lotes da VFA e comparado com o controle de LPS (<20%), sendo este considerado o padrão de referência interno do ensaio (Tabela 12). Os CVs do LPS e dos lotes da VFA apresentaram resultados dentro dos limites descritos na literatura (Hasiwa et al, 2013) e estipulada como adequada para ensaios biológicos segunda a OMS (1997).

Tabela 12

Análise intra-ensaio de lotes da VFA no MAT utilizando sangue criopreservado com detecção de IL-6 como parâmetros de leitura.

Amostras	Concentração de IL-6 (pg/mL)				
	Controle NaCl+	Lote VFA + ^a	Média	Desvio	CV
LPS 0,5 UE/mL	181,14	-	170,76	7,20	4,2
	170,10				
	166,10				
	165,70				
Lotes VFA A	-	287,74	304,55	19,83	6,5
		315,83			
		287,88			
		326,74			
B	-	341,02	341,02	19,08	5,6
		366,66			
		320,88			
		335,52			
C	-	324,48	336,04	14,98	4,4
		326,47			
		357,22			
		339,01			

^a Resposta da liberação de IL-6 para o estímulo de 0,5 UE/mL derivada do LPS de *E.coli* O55:B5 por ELISA em sangue criopreservado de matriz monocítica formada por 4 doadores.

5.5.5 Análise inter-ensaio (IL-6)

A análise inter-ensaio foi avaliada para determinar a confiabilidade dos ensaios que são assegurados pela determinação do CV – que corresponde a

variação nos valores obtidos na dosagem das amostras em placa realizadas em dias diferentes. Assim, foram avaliados os componentes de variância das concentrações de IL-6 liberadas pelo estímulo com 0,5 UE/mL de LPS.

Conforme demonstrado na Tabela 13 foi possível observar um perfil similar de CV entre os controles de LPS em dias diferentes, sendo este considerado o padrão de referência interno do ensaio. A análise do lote de VFA apresentou valores de CV similares entre os dias e quando comparado ao do LPS, estando estes resultados dentro dos limites descritos na literatura (<20%) (Hasiwa et al, 2013) e estipulada como adequada para ensaios biológicos segunda o OMS (1997).

Tabela 13

Análise inter-ensaio de lotes da VFA no MAT utilizando sangue criopreservado com detecção de IL-6 como parâmetros de leitura.				
Amostras	Dia 1		Dia 2	
	IL-6 (pg/mL) ^a	%	IL-6 (pg/mL) ^a	%
	Replicata	Recuperação ^b	Replicata	Recuperação ^b
LPS	181,14	100,0	171,21	100,0
	170,10		176,90	
	166,10		175,05	
	165,70		187,82	
Média	170,76		177,74	
Desvio	7,20		7,12	
CV	4,2		4,0	
Lotes VFA				
A	287,74	178,3	129,00	73,9
	315,83		121,82	
	287,88		143,05	
	326,74		131,29	
Média	304,55		131,30	
Desvio	19,83		8,81	
CV	6,5		6,7	

^a Resposta da liberação de IL-1 β para o estímulo de 0,5 UE/ mL derivada do LPS de *E.coli* O55:B5 por ELISA em sangue criopreservado com *pool* de 4 doadores.

^b A recuperação foi calculada a partir da média da leitura de 4 replicatas dos resultados de VFA contaminadas artificialmente com 0,5/UEmL (VFA+) e a mesma amostra não contaminada (VFA-) aplicando a seguinte fórmula: % de recuperação (VFA+) - VFA(-) x 100 / 0,5). Os valores de endotoxina recuperada foi aplicada pela diferença VFA x 0,5 / pelo valor da leitura do ponto da curva 0,5 UE/mL.

5.6 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS EM SANGUE TOTAL FRESCO COM DETECÇÃO DE IL-6

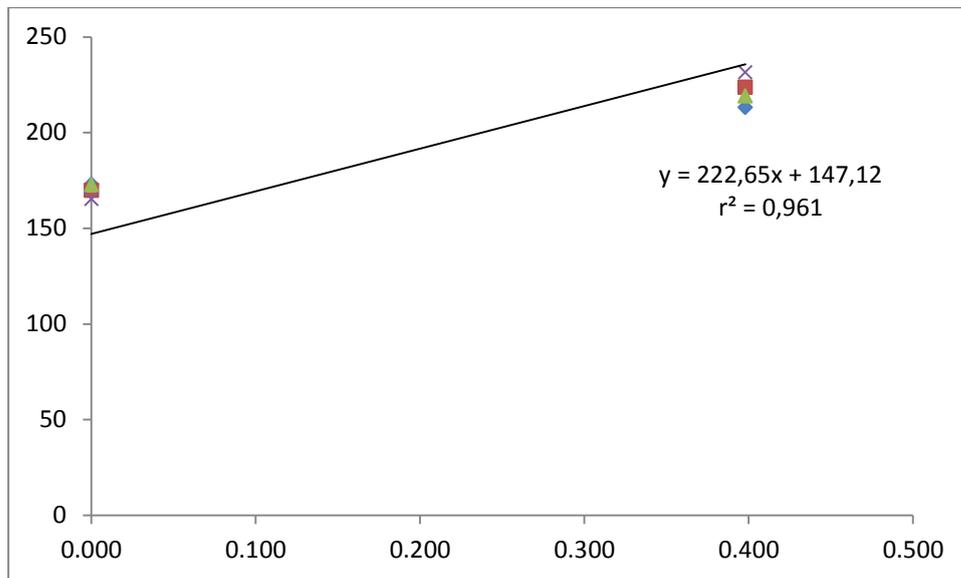
Neste capítulo serão apresentados dados referentes à detecção de IL-6 em sangue total fresco.

5.6.1 Qualificação das células provenientes do sangue fresco para o ensaio com IL-6

Os sangues frescos dos doadores foram avaliados utilizando a detecção de IL-6, método válido pelo ICCVAM para detecção de LPS. Amostras de sangue de 4 doadores foram reunidas, para formar a matriz monocítica do ensaio (matriz 2), e qualificados de acordo com a FE. A matriz foi desafiada frente a uma curva padrão de LPS de *E.coli* nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0 e 2,5 UE/mL e o controle negativo. Os resultados demonstraram que o nível basal de liberação da citocina não interferiu na interpretação da curva dose-resposta e que esta apresentou valores a liberação de IL-1 β dependente da concentração de LPS (Figura 14).

As interpretações foram baseadas nos parâmetros estatísticos preconizados pela FE, que prioriza a avaliação de 2 critérios para validar a sangue. (1) regressão da resposta com valores de $p^1 < 0,01$ e (2) a relação linearidade e regressão da resposta não deve desviar significativamente, com valores de $p^2 > 0,05$. Todos os parâmetros para a aceitação da validade do ensaio foram alcançados de modo satisfatório, sendo a regressão da resposta com $p^1 = 0,003$ e a relação linear entre as concentrações e as respostas confirmada pelo valor de $p^2 = 0,493$. Adicionalmente, o coeficiente de determinação (r^2) também foi utilizado para avaliar estatisticamente a linearidade da curva, apresentando valor de $r^2 = 0,961$ (Tabela 14, Figura 14).

Figura 14- Curva padrão de endotoxina em sangue fresco para a detecção de IL-6.



Eixo x: Log da dose de LPS; Eixo y: concentração de IL-6 (pg/mL).

Tabela 14

Avaliação dos critérios de aceitação da matriz monocítica para a detecção de IL-6 em sangue fresco desafiado pela curva de LPS.

Curva LPS		IL-6 (pg/mL)
UE/mL	Log dose	
0	-	<3,12
0,25	-0,60206	26,611
0,50	-0,30103	86,034
1,00	0	170,165
2,50	0,39794	221,90
r^2	-	0,961
p^1	-	0,003
F	-	1,022
$p^2(F)$	-	0,493

r^2 : coeficiente de determinação; p^1 : $p < 0,01$, p^2 : $p < 0,05$ foi utilizado para demonstrar a diferença estatisticamente significativa entre os dois coeficientes. F: Teste T de Fisher.

5.6.2 Método A: teste quantitativo (IL-6)

De modo a avaliar o comportamento das amostras no sangue fresco, 3 lotes da VFA foram avaliados para a detecção de IL-6 como parâmetros de leitura. Com o intuito de comparar as citocinas provenientes do mesmo contato, foi comparado o perfil de liberação de citocinas em VFA diluídas 1/10 (padrão utilizado na leitura de IL-1 β) com a diluição 1/40 (diluição de recuperação próxima da média e entorno de 100%). De acordo com o teste de interferência realizado anteriormente, foram avaliadas as diluições de 1/10 e 1/40, para avaliar a recuperação do LPS adicionalmente artificialmente nas VFA.

De acordo com estes resultados, foi observado que apesar da qualificação do sangue fresco como matriz monocítica ter atendido aos critérios de aceitação quando desafiada pela curva de LPS, os dados de recuperação de LPS adicionados artificialmente na VFA ficaram abaixo do limite de aceitação tanto a diluição 1/10 como 1/40, apesar de ter sido confirmada a ausência de LPS na amostra como confirmado pelos ensaios anteriores, este sistema de detecção não se mostrou adequado para análise da VFA (Tabela 15).

Tabela 15

Análise comparativa da diluição da VFA para a recuperação de endotoxina (%) obtida no teste interferente no MAT utilizando sangue fresco com detecção de IL-6 como parâmetros de leitura.

Amostra	Diluição	Concentração de IL-6 (pg/mL)			Diferença (b-a)	Taxa recuperação ^c	Recuperação UE/mL
		Controle NaCl+ (cut-off)	Lote VFA- (a)	Lote VFA+ (b)			
LPS	0,5UE/mL	86,03				100	0,5
Lotes VFA							
A	1/10		<3,12	22,87	22,87	26,6 ^F	0,13
B	1/10		<3,12	20,89	20,89	24,3 ^F	0,12
C	1/10		<3,12	10,58	10,58	12,3 ^F	0,06
Média			-	-	-	21,06	0,10
Lotes VFA							
A	1/40		<3,12	21,04	21,04	24,4 ^F	0,12
B	1/40		<3,12	18,03	18,03	20,9 ^F	0,10
C	1/40		<3,12	21,61	21,61	25,1 ^F	0,12
Média			-	-	-	23,46	0,11

^c A recuperação foi calculada a partir da média da leitura de 4 replicatas dos resultados de VFA contaminadas artificialmente com 0,5/UEmL (VFA+) e a mesma amostra não contaminada (VFA-) aplicando a seguinte fórmula: % de recuperação (VFA(+) – VFA(-) x 100) / 0,5). Os valores de endotoxina recuperada foi aplicada pela diferença VFA (b-a) x 0,5 / pelo valor da leitura do ponto da curva 0,5 UE/mL. Todos os resultados apresentaram taxa de recuperação abaixo de 50%. Limite de sensibilidade de teste: 3,12 pg/mL. Limite aceitação de recuperação (50-200%). ^F: falha nos parâmetros de aceitação.

5.6.3 Análise intra-ensaio (sangue fresco – IL-6)

Apesar de o ensaio ter ficado fora da especificação, à análise intra-ensaio foi avaliada para determinar a confiabilidade dos ensaios que são assegurados pela determinação do CV – que corresponde a variação nos valores obtidos na dosagem das amostras na mesma placa realizadas em quadruplicada. Assim, foram avaliados os componentes de variância das concentrações de IL-6 liberadas pelo estímulo com 0,5 UE/mL de LPS. Conforme demonstrado na Tabela 16, foi possível observar um perfil similar de CV entre os lotes da VFA quando comparado com o controle de LPS, sendo este considerado o padrão de referência interno do ensaio.

Tabela 16

Análise intra-ensaio de lotes da VFA no MAT utilizando sangue fresco com detecção de IL-6 como parâmetros de leitura.

Amostras	Concentração de IL-6 (pg/mL)				
	Controle NaCl+	Lote VFA + ^a	Média	Desvio	CV
LPS 0,5 UE/mL	85,02	-	86,03	1,963	2,28
	88,32				
	83,39				
	86,89				
Lotes VFA A	-	21,22	22,88	1,173	5,13
		22,92			
		23,50			
		23,87			
Lotes VFA B	-	19,68	20,89	1,097	0,76
		20,26			
		21,65			
		21,98			
Lotes VFA C	-	9,61	10,58	0,656	6,21
		11,03			
		10,90			
		10,79			

^a Resposta da liberação de IL-1 β para o estímulo de 0,5 UE/mL derivada do LPS de *E.coli* O55:B5 por ELISA em sangue criopreservado de matriz monocítica formada por 4 doadores.

5.7 ANÁLISE COMPARATIVA IL-1 β e IL-6

De modo a avaliar a homogeneidade dos ensaios utilizando os dois sistemas de leitura em sangue criopreservado, IL-1 β e IL-6, os parâmetros de variabilidade inter- e intra-frascos foram analisados pelo CV do LPS e das amostras da VFA.

No padrão de endotoxina e em amostras contaminadas com 0,5 UE/mL de LPS foram calculados os CVs que demonstraram valores menores que 20%. Os resultados obtidos foram considerados homogêneos, visto que todos os CVs foram inferiores a este valor (Tabela 17), logo encontrando dentro do limite de aceitação. Estes limites foram embasados nos dados da literatura (Hasiwa et al, 2013) e estipulados como adequados para ensaios biológicos segunda a OMS (1997), que aceita o valor de até 50 % de variabilidade para ensaios biológicos.

De maneira interessante, os ensaios com IL-6 apresentaram valores de CV menores tanto para o padrão de LPS quanto para os lotes de VFA quando comparadas com os CV encontrados para IL-1 β , apesar destes estarem dentro dos valores preconizados (Tabela 18). Estes dados são corroborados pela análise inter-ensaio, onde os CV do LPS e das amostras VFA nas leituras realizadas pelo IL-6 apresentaram valores menores em dias diferentes (Tabela 18).

Tabela 17

Análise comparativa dos resultados intra-ensaios dos lotes da VFA e LPS no MAT utilizando sangue criopreservados pela detecção de IL-1 β e IL-6 como parâmetros de leitura.

Citocinas	CV intra-ensaios (%)			
	IL-1 β		IL-6	
Amostra	LPS	VFA ^a	LPS	VFA ^a
	17,53	6,3	4,22	6,5
		14,6		5,6
		9,1		4,4

^a Resultado de 3 lotes diferentes da VFA (A, B e C).

Tabela 18

Análise comparativa dos resultados inter-ensaios dos lotes da VFA e LPS no MAT utilizando sangue criopreservados pela detecção de IL-1 β e IL-6 como parâmetros de leitura.

Citocinas	CV inter-frasco			
	IL-1 β		IL-6	
Amostra	LPS	VFA ^a	LPS	VFA ^a
Dia 1	17,53	6,32	4,22	6,51
Dia 2	12,75	19,97	4,00	6,71

^a Resultado do lote (A) da VFA.

De modo a verificar a relação entre IL-1 β /IL-6 frente ao LPS em sangue criopreservado, foi aplicado o cálculo de correlação que demonstrou um valor de $p=$

0,943, sendo este valor correspondendo a uma correlação positiva entre análises utilizando o modelo de sangue criopreservado (Figura 15). Esta mesma análise foi realizada com os lotes de VFA estimuladas com LPS e o valor de p encontrado foi de $p= 0,625$ (Figura 16).

Figura 15 - Análise de correlação da resposta de liberação de IL-1 β e IL-6 frente ao LPS em sangue criopreservado.

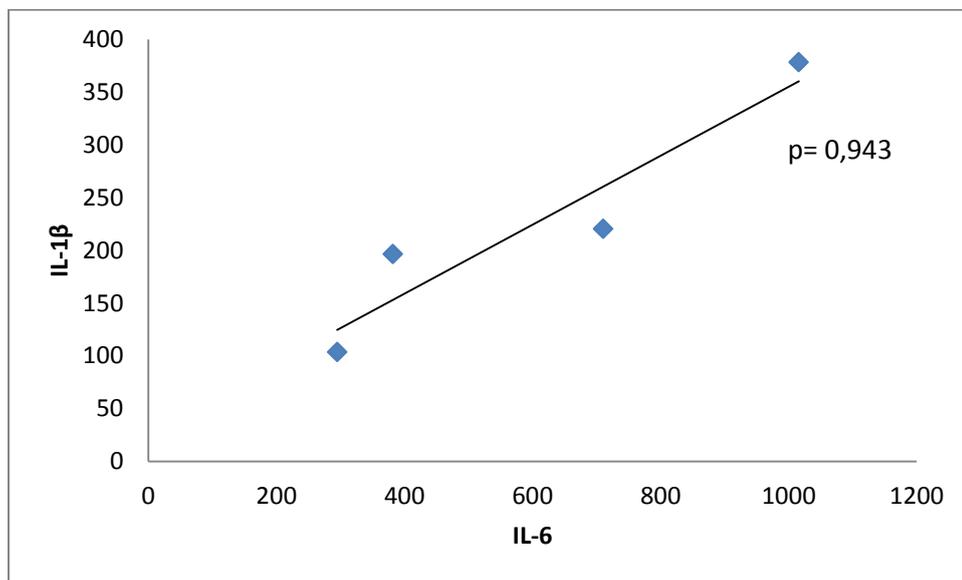
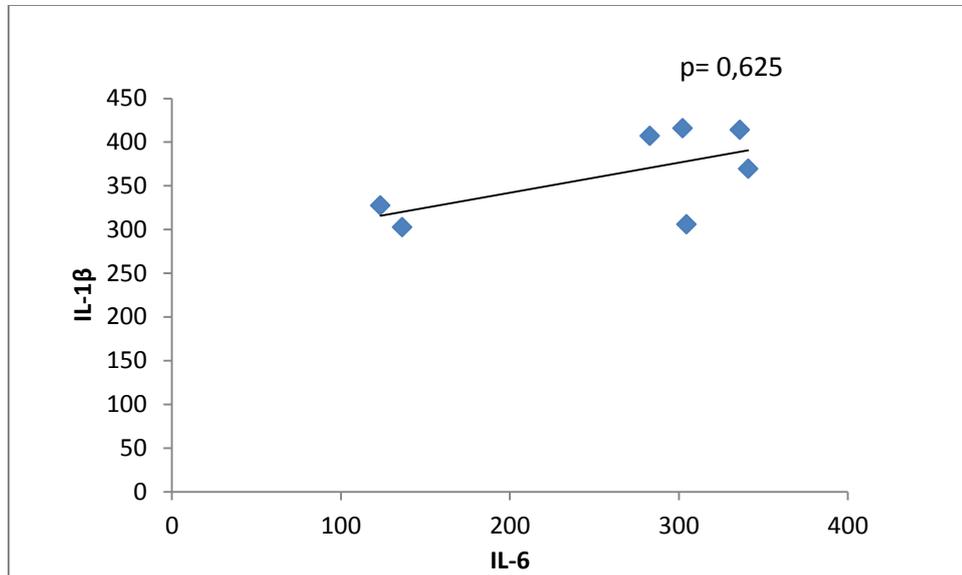


Figura 16 - Análise de correlação da resposta de liberação de IL-1 β e IL-6 frente aos lotes de VFA em sangue criopreservado.



5.8. ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE MAT E LAL

Uma análise comparativa entre o LAL e o MAT foi realizada de modo a demonstrar a correlação entre os métodos. Esta análise foi realizada baseada nos dados de recuperação de LPS exógeno obtidos do LAL e MAT (Tabela 19). Os gráficos demonstram relação positiva entre o LAL e MAT/IL-1 β e LAL e MAT/IL-6 com valores de $p = 0,571$ e $p = 0,739$, respectivamente (Figura 17). Apesar das análises demonstrarem correlação positiva entre as técnicas, os valores de LAL e MAT/IL-6 foram mais próximos de 1, sugerindo uma maior correlação entre IL-6 do que IL-1 β frente ao método de referência utilizado na detecção de LPS na unidade e preconizado pela monografia do produto, o LAL.

Tabela 19

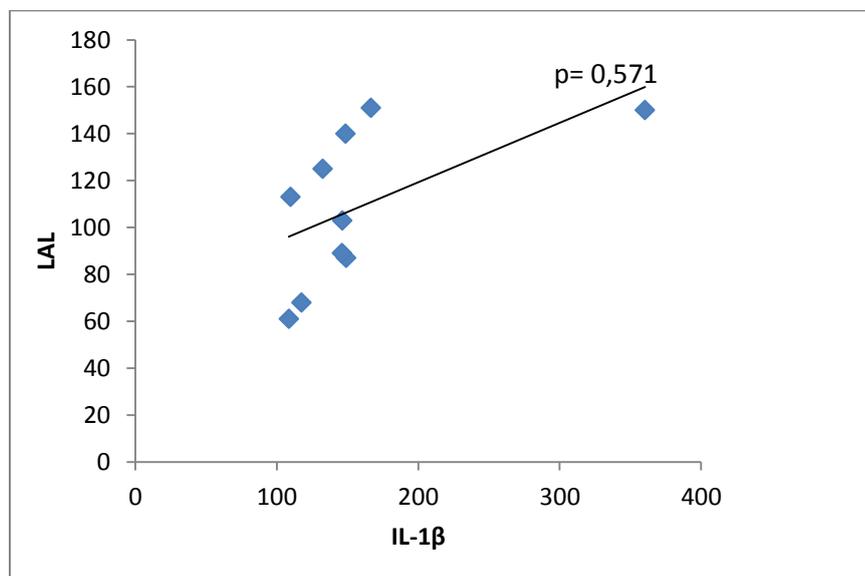
Análise comparativa dos resultados de recuperação (%) nos ensaios de LAL e MAT em sangue criopreservado com parâmetro de leitura IL-1 β e IL-6.

Amostras	IL-1 β (crio) Spike 0,5 UE/mL	IL-6 (crio) Spike 0,5 UE/mL	LAL LPS 0,5 UE/mL
A	109,7	178,3	113
B	132,6	199,7	125
C	148,6	196,6	140
D	117,5	72,3	68
E	149,2	177,0	87
F	108,6	79,8	61
G	146,1	165,6	89
H	146,4	71	103
I	166,7	172,0	151
J	360,3 ^F	321,8 ^F	150

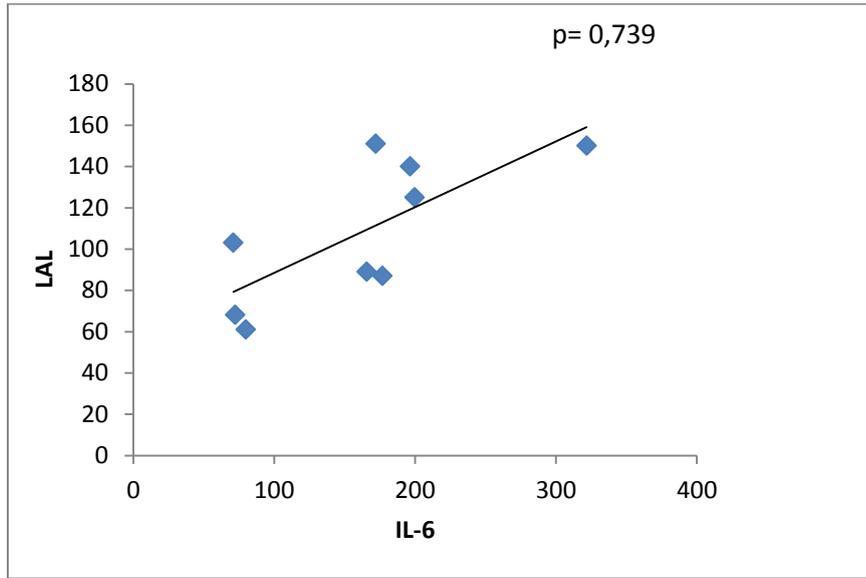
^F: falha nos parâmetros de aceitação

Figura 17 - Análise de correlação entre os ensaios LAL e MAT, baseados nos dados de recuperação de LPS (%). (A) Análise de correlação LAL x MAT IL-1 β e (B) LAL x MAT/IL-6.

(A)



(B)



6 DISCUSSÃO

O RPT foi desenvolvido nos anos 1940, durante um momento da história mundial em que havia grande demanda por um método oficial capaz de detectar contaminação pirogênica em parenterais de grande volume. Para o processo de produção e controle da qualidade de produtos estéreis, este método tornou-se mandatório e por este motivo, manteve-se como modelo para a avaliação da contaminação pirogênica em diversos setores industriais. No entanto, várias limitações do RPT, tais como, implicações éticas, manejo dos animais e variabilidade biológica estimularam o desenvolvimento de métodos alternativos (NAVEGA *et al*, 2015). O LAL - ou teste de endotoxina bacteriana - foi o primeiro método alternativo ao RPT. Surgiu na década de 1970, *i.e.* há cerca de quarenta anos atrás, e a partir de então tem sido amplamente utilizado devido às limitações dos testes *in vivo* citadas acima (VIPOND, 2016; FENNRICH *et al*, 2016).

Apesar das vantagens e da significativa redução do número de animais utilizados nos processos de controle da qualidade e produção de produtos de uso médico, advindas da incorporação do LAL em compêndios oficiais, há de se destacar que esse método *in vitro* não é capaz de substituir por completo o RPT, uma vez que por definição, ele é um teste de detecção de endotoxina, e não um teste de pirogênio, pois falha em reconhecer outras classes de agentes pirogênicos como Gram-positivas, fungos, vírus e toxóides (POOLE & GAINES, 2001).

Assim, ainda hoje, cerca de 70 anos após o desenvolvimento do RPT, persiste a necessidade de aprimoramento das metodologias alternativas ao ensaio *in vivo* para que se alcance a plena substituição do modelo animal nos processos de detecção de contaminantes pirogênicos. O LAL apresenta benefícios indiscutíveis, tais como rapidez e facilidade de execução. No entanto, além da importante limitação mencionada acima, relacionada ao fato de não detectar parte dos contaminantes pirogênicos, alguns produtos sujeitos à ação da vigilância sanitária não podem ser testados neste modelo *in vitro*. Isso ocorre devido à capacidade da endotoxina de se ligar a proteínas plasmáticas – como, por exemplo, proteínas presentes em amostras de soros antipeçonhentos – e não ser detectada, já que o LAL quantifica somente endotoxina livre, podendo assim, levar a resultados falso negativos (SILVA *et al*, 2015). Outros produtos biológicos, como as vacinas

recombinantes contra Hepatite B, apresentam componentes inerentes a sua constituição, por exemplo o hidróxido de alumínio, que é considerado um interferente no LAL. Esse interferente se liga à endotoxina, induzindo, também nesse caso, resultado falso negativo (OCHIAI *et al*, 2001, PARK *et al*, 2005).

Neste contexto, é importante destacar o fato das vacinas serem formulações cada vez mais complexas; formuladas com múltiplos componentes e desenvolvidas a partir de tecnologias inovadoras e com adjuvantes novos, sendo o teste de interferentes sempre preconizado para cada novo produto.

Enquanto a utilização do LAL não é aplicável em situações como aquelas descritas acima, há também os casos em que o RPT não é o melhor modelo recomendado. Isso se deve ao fato de imunobiológicos serem formulações preparadas para evocar a resposta imune inata do indivíduo que os recebem, tornando muitas vezes o coelho um modelo inadequado, devido à resposta inflamatória induzida pelo próprio produto em teste e, conseqüentemente, à possibilidade de indução de resultados falso positivos (VIPOND *et al*, 2016).

É nesse contexto que surge o MAT, desenvolvido em 2010, é considerado um método *in vitro* que substitui plenamente o coelho na detecção de um amplo espectro de agentes pirogênicos, entre eles aqueles de origem Gram-positivas, fungos e vírus. É considerado um método alternativo por fornecer dados quantitativos, em um sistema que mede as respostas inflamatórias humanas e garante a segurança, a eficácia e a qualidade de vacinas e outros produtos de interesse para a saúde. É um modelo promissor, mas que precisa sofrer melhorias para que possa ser plenamente aplicado e em larga escala, por exemplo nos processos de liberação de lotes de vacinas, soros hiperimunes e biofármacos. Dessa forma, o debate sobre a possibilidade de desenvolver e aprimorar cientificamente alternativas válidas aos experimentos em animais e com a capacidade de detecção de um amplo espectro de pirogênicos permanece - ainda hoje - em destaque na literatura científica (FENNRICH *et al*, 2016).

A comparação entre os métodos *in vivo* e *in vitro* com aceitação regulatória e preconizados para a detecção de pirogênicos, assim como as principais vantagens e desvantagens de cada abordagem metodológica, estão resumidos na Tabela 20.

Tabela 20: Comparação entre métodos de detecção de pirogênios.

Teste de pirogênio	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>
	RPT	LAL	MAT
Sistema teste	- Coelho	- Linfa de caranguejo- ferradura	- Células monocíticas humanas
Princípio do teste	- Febre animal	- Defesa do artrópode	- Febre humana
Especificidade	- Todos os pirogênios	- Endotoxina	- Todos os pirogênios
Limite de detecção	- 5 UE/mL	- 0,03-0,005 UE/mL	- 0,03 UE/mL
Tipo do teste	- Teste qualitativo	- Teste qualitativo/quantitativo	- Teste qualitativo/quantitativo
Vantagens	- Detecta todos os pirogênios - Padrão ouro dos ensaios de pirogênios	- Rápido - Fácil execução - Redução do prazo de análises	- Detecta todos os pirogênios - Rápido - Fácil execução - Redução do prazo de análises - Aplicável a todos os produtos
Desvantagens	- Variabilidade biológica - Não aplicável a todos os produtos - Alto custo de manutenção dos animais - Questões éticas	- Detecta somente endotoxinas - Não aplicável a todos os produtos - Questões éticas	- Necessidade de validação produto a produto - Qualificação das matrizes celulares

Fonte: Adotado e modificado de uma revisão de Melandri et al. 2010.

6.1 APLICABILIDADE DO MAT

Em que pese pesquisas sobre a aplicabilidade do método MAT para novos produtos, o ICCVAM (2008) recomenda que se realize uma avaliação paralela do produto em questão usando os três métodos existentes, *i.e.* o MAT, o LAL e o RPT. No entanto, para o caso específico da VFA, o LAL foi o único método de escolha encontrado em compêndios oficiais (FB, 2010). Por essa razão, no presente estudo foram realizados ensaios para determinação da possível equivalência de resultados pelo teste quantitativo cinético-cromogênico de LAL, nos mesmos lotes de VFA/10 doses que seriam ensaiados no MAT. Todos os parâmetros para aceitação da validade do LAL foram alcançados de modo satisfatório e todos os lotes da VFA/10 doses apresentaram valores de endotoxina abaixo dos limites aceitáveis (<5 UE/mL).

Nos últimos anos, observa-se na literatura científica um crescimento significativo no número de manuscritos que pretendem investigar a aplicabilidade do MAT para novos produtos e tecnologias, entre eles os produtos biológicos (HARTUNG, 2015). Nos processos de produção de diferentes cepas *Neisseria meningitidis* do grupo B, por exemplo, o MAT demonstrou ser altamente sensível na detecção de pirogênios pelo sistema de liberação de IL-6 e TNF- α do sangue total humano e de PBMCs (STODDART *et al*, 2010). Perdomo-Morales e colaboradores (2011) também estudaram a aplicação do MAT em produtos de origem biológica e afirmam que é possível a substituição do RPT por esse modelo alternativo, concluindo que o MAT é um modelo que apresenta relevância e confiabilidade para a avaliação de segurança de amostras de albumina sérica humana e outros derivados que contenham proteínas de uso terapêutico. Os mesmos autores alertam para um fato de grande relevância em termos de risco sanitário, e que diz respeito ao baixo percentual de recuperação de endotoxinas em amostras de albumina sérica humana pelo LAL, apesar deste ser o método preconizado oficialmente para o produto em questão (PERDOMO-MOARELES *et al*, 2011).

Estudo mais recente, conduzido por Silva e colaboradores (SILVA *et al*, 2016), demonstrou que o MAT pode ser aplicado para a detecção de endotoxina em uma variedade de amostras de soros hiperimunes, incluindo soro antibotrópico, soro anticrotálico, soro antirrábico, soro antitetânico, soro anti-elapídico, soro anti-escorpiônico. O MAT apresentou sensibilidade e especificidade adequadas em

relação ao RPT, tanto nas amostras de rotina (*batch release*), como nas amostras contaminadas artificialmente. Importante destacar, que o MAT foi mais sensível que o RPT na detecção de amostras contaminadas artificialmente com zymosan e que esse dado se confirmou na análise de amostras de rotina.

De fato, a realização de estudos sobre a aplicabilidade do MAT conduzidos no âmbito da produção e do controle da qualidade de soros hiperimunes e vacinas é especialmente importante no cenário brasileiro, considerando que produtos biológicos são a principal classe de medicamentos injetáveis que requerem testes de pirogenicidade, e o RPT é o único método preconizado para boa parte desses produtos pela FB (SILVA *et al*, 2015).

6.2 O MÉTODO MAT E SEUS VARIANTES

Há mais de vinte anos atrás, Taktak e colaboradores (1991) demonstraram o desenvolvimento de um método para detecção de contaminação pirogênica *in vitro* fundamentado na liberação de IL-6, a partir de células da linhagem celular MM6. Nesse estudo, amostras de HSA foram testadas e consideradas positivas no modelo MM6/IL-6 (Tabela 21). A sugestão atribuída pelos autores é que esse mecanismo represente uma alternativa mais adequada para testar a contaminação de produtos parenterais, devido aos resultados falso negativos apresentados pelo LAL para parte desses produtos (TAKTAK *et al*, 1991)

Em 1996, Hartung e Wendel chegaram à conclusão que após estímulo *in vitro* do sangue total com bactérias Gram-negativas e NEPs, havia liberação de IL-6 de forma concentração-dependente. Na literatura científica podemos encontrar outras abordagens metodológicas e a utilização de diferentes sistemas celulares, entre eles o uso de células monocíticas de diferentes origens, como o sangue de coelho e o sangue bovino (Tabela 21). Schindler e colaboradores (2003) fizeram uma comparação utilizando sangue de coelho e sangue humano no MAT para quantificar IL-1 β e IL-8. Nesse estudo, somente o sangue humano liberou IL-1 β e apresentou maior reatividade que o sangue de coelho para IL-8 (Tabela 21). Segundo alguns autores, o sangue bovino poderia suprir dificuldades operacionais relacionadas ao uso de sangue humano; os animais poderiam ser criados sob condições livres de

patógenos específicos. No entanto, os resultados obtidos com o sangue bovino demonstraram menor desempenho na liberação de pirogênios, quando comparados ao uso do sangue humano (WUNDERLICH *et al*, 2014).

Para além do setor farmacêutico, a aplicabilidade do MAT em novas áreas, tem sido linha de pesquisa de diversos grupos nacionais e internacionais (SILVA, 2015; FENNRICH *et al*, 2016). Nesse sentido, cabe destaque o estudo da detecção de pirogênio em amostras de ar ambiente, como método complementar ao teste microbiológico, contribuindo assim para uma melhor avaliação da qualidade do ar de interiores. A avaliação do uso do MAT para a detecção de contaminação pirogênica em produtos para a saúde é outra linha importante de investigação que apresenta impacto direto nas ações de Vigilância Sanitária (Tecnovigilância).

Atualmente existem cinco sistemas validados internacionalmente para a utilização do MAT em medicamentos injetáveis: (1) sangue total humano/IL-1 β ; (2) sangue total humano/IL-1 β em sangue criopreservado, (3) sangue total humano/IL-6, (4) células mononucleares do sangue periférico/IL-6 e (5) linhagem celular Mono Mac 6 (MM6) /IL-6 (ICCVAM, 2008). Apesar do sistema sangue total/IL-6 em sangue criopreservado não estar ainda validada internacionalmente, esse sistema apresentou melhores resultados nos nossos estudos, quando comparado com sangue criopreservado/IL-1 β e sangue fresco/IL-6 (Tabela 21).

Tabela 21: Variantes dos sistemas do ensaio MAT.

Testes	Sistemas	Leitura	Fonte
WBT/IL-1 β *	Sangue Total Humano	Interleucina-1 β	ICCVAM, 2008
Cryo WBT/IL-1 β *	Sangue Total Humano Criopreservado	Interleucina-1 β	ICCVAM, 2008
WBT/IL-6*	Sangue Total Humano	Interleucina-6	ICCVAM, 2008
PBMC/IL-6*	Células Mononucleares do Sangue Periférico	Interleucina-6	ICCVAM, 2008
MM6/IL-6*	Linhagem Celular Monocítica Monomac-6 (MONOMAC-6)	Interleucina-6	ICCVAM, 2008
PBMC/IL-6 MM6/IL-6	Células Mononucleares do Sangue Periférico / MONOMAC-6	Interleucina-6	Hoffmann <i>et al</i> , 2005
MM6/IL-6	Linhagem Celular Monocítica MONOMAC-6	Interleucina-6	Taktak <i>et al</i> , 1991
PBMC/IL-1 β /IL-6	Células Mononucleares do Sangue Periférico	Interleucina-1 β /IL-6	Hansen, 1990; Christensen, 1990
bWBT/PGE ₂	Sangue Total Bovino	Prostaglandina E ₂	Wunderlich <i>et al.</i> , 2014
rWBT/ IL-1 β /IL-8	Sangue Total de coelho	Interleucina-1 β /IL-8	Schindler, 2003
WBT/IL-6	Sangue Total Humano	Interleucina-6	Stoddart, 2010
PBMC/IL-6	PBMC isolado de filtros linfocitários	Interleucina-6	Koryakina <i>et al</i> , 2014
IL-1 β /IL-6	Sangue Total Humano Criopreservado	Interleucina1 β /IL-6	Navega, 2016
IL-6	Sangue Total Humano	Interleucina-6	Navega, 2016

WBT: Sangue Total humano (*Whole Blood Total*), Cryo/WB: Sangue Total Humano Criopreservado (*Cryopreserved Whole Blood*), PBMC: Células Mononucleares do Sangue Periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*), bWBA: Sangue Total Bovino (*bovine Whole Blood Assay*), rWBT: Sangue Total de coelho (*Rabbit Whole Blood Total*). * Sistemas do MAT validados pela ICCVAM. Fonte: Adaptado e modificado por revisão Navega *et al*, 2015.

Apesar da aceitação oficial do MAT para teste de pirogênios (FE, 2010), a sua utilização é limitada devido a restrições práticas relacionadas à manipulação do sangue humano fresco e à prática da flebotomia (SCHINDLER *et al*, 2009). Essas são as principais dificuldades relacionado ao uso do MAT e está relatada em alguns artigos científicos, além disso, há a dificuldade de se conseguir grandes volumes de sangue (KORYAKINA, 2014; WUNDERLICH, 2014; KIETZMANN, 2014), sendo essa uma limitação importante principalmente para rotina em laboratório com grande escala e produção. Em 2004, como alternativa ao uso de sangue fresco, foi desenvolvido o uso de sangue criopreservado, validado em 2006 (SCHINDLER *et al*, 2006). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as respostas após estímulo por endotoxina, em relação ao IL-1 β dos doadores individuais e do *pool* de sangue após o descongelamento (SCHINDLER *et al*, 2006; SILVA, 2015).

A validação do sangue criopreservado contornou uma desvantagem do MAT em relação ao número de doadores para cada ensaio. A FE recomenda o uso de *pool* para diminuir as variações interindividuais entre o sangue dos doadores (SCHINDLER *et al*, 2006). Silva (2015) demonstrou que amostras de sangue individual e *pool* de sangue criopreservados, armazenados a -80°C, são capazes de responder ao estímulo de endotoxina durante 4 meses (SILVA, 2015b). A padronização da criopreservação também permitiu o desenvolvimento de kits comerciais para utilização do MAT, facilitando o processo de aquisição e validação do sangue (SCHINDLER *et al*, 2006).

Devido à vantagem da criopreservação na logística funcional, optamos por iniciar os ensaios do MAT com sangue criopreservado qualificando as células provenientes de um *pool* de 4 doadores (ICCVAM, 2008) para formar a primeira matriz monocítica. Os resultados demonstraram que o nível basal de liberação da citocina não interferiu na interpretação da curva dose-resposta, tornando a matriz favorável para o ensaio de liberação de citocinas.

A segunda matriz monocítica foi formada com *pool* de diferentes doadores para fins comparativos entre sangue fresco e criopreservado para detecção de IL-6. Os resultados também demonstraram que o nível basal de liberação da citocina não interferiu na interpretação da curva dose-resposta.

O segundo passo foi a realização do teste de interferentes para VFA com 3 lotes da vacina estéreis e apirogênicas, segundo critérios de aprovação do LAL descritos na monografia do produto na FB. A vacina foi avaliada pura e com diluições progressivas geométricas até 1/320 com base no cálculo do MVD.

A recuperação de LPS dentro da faixa preconizada para o ensaio, entre 50-200%, ocorreu em todas as diluições, inclusive na amostra não diluída. A média de recuperação de LPS entre as diluições da VFA foi de 104,2% para IL-1 β . No teste de interferentes para IL-6 a diluição 1/160 apresentou resultado >200%, esse valor não foi considerado por estar fora da especificação, a média encontrada foi de 127,9%.

Com o intuito de comparar a resposta das citocinas provenientes do mesmo contato, foi estabelecido diluição de 1/10 como a diluição mínima válida (MinDV).

Nosso estudo selecionou o método quantitativo para construção de uma curva concentração-resposta de LPS, baseada na faixa de 0,25 a 2,5 UE/mL a partir do sorotipo O55:B5 de *E. coli* como controle positivo. A concentração de endotoxina de 0,5 UE/mL corresponde a 50 pg/mL (referência internacional). Esta concentração foi considerada o limite de endotoxina escolhida por corresponder à dose que causa febre na maioria das cepas de coelho. Este limiar foi confirmado em um estudo realizado no Instituto Paul-Ehrlich, que incluiu 171 coelhos (HOFFMAN et al, 2005b).

Para avaliar a capacidade do MAT em detectar quantitativamente o LPS pelo método A, 10 lotes da VFA foram diluídos 1/10 para verificar presença de endotoxina e o percentual de recuperação de LPS (0,5UE/mL) em sangue criopreservado.

Todos os lotes foram analisados pelos sistemas sangue criopreservado/IL-1 β /IL-6, com resultados negativos para a presença de LPS, porém no critério de recuperação do LPS exógeno, apenas o lote J de ambas interleucinas se encontrou fora das especificações. A amostra J foi testada proveniente do mesmo contato de sangue para liberação de IL-6 e IL-1 β . É necessário repetir os experimentos no MAT com essa amostra para confirmar se realmente a recuperação encontra-se superior a 200%, sabendo que análise realizada pelo método LAL, a amostra J foi encontrada dentro das especificações esperadas.

De modo a avaliar o comportamento das amostras no sangue fresco, 3 lotes da VFA foram diluídos 1/10 para a detecção de IL-6 como parâmetros de leitura. Os dados de recuperação de LPS na VFA ficaram abaixo do limite de aceitação. Este sistema de detecção não se mostrou adequado para análise da VFA, apesar de ter sido confirmada a ausência de LPS nas amostras. O ensaio utilizando sangue fresco deverá ser repetido para confirmar se o comportamento das amostras de VFA continua inadequado.

A confiabilidade dos ensaios que são assegurados pela determinação do CV, apresentou um perfil similar entre os lotes da VFA quando comparados com o controle de LPS (<20%), nas análises intra- e inter-ensaio. Os CVs do LPS e dos lotes da VFA em ambos os sistemas sangue criopreservado/IL-1 β /IL-6, apresentaram resultados dentro dos limites descritos na literatura (HASIWA *et al*, 2013) e estipulados como adequados para ensaios biológicos segundo a OMS (1997).

Apesar do ensaio com sangue fresco/IL-6 ter ficado fora da especificação, também foi possível observar um perfil similar de CV entre os lotes da VFA quando comparado com o controle de LPS.

Na comparação dos dois sistemas de leitura em sangue criopreservado/IL-1 β e IL-6, os parâmetros de variabilidade inter- e intra-frascos foram considerados homogêneos; todos os CVs foram inferiores a 20%, dentro do limite de aceitação (HASIWA *et al*, 2013), adequados para ensaios biológicos segundo a OMS (1997), que aceita o valor de até 50 % de variabilidade para ensaios biológicos.

Ao comparar LAL e MAT/IL-1 β e LAL e MAT/IL-6, ambos demonstraram correlação positiva entre as técnicas, os valores de LAL e MAT/IL-6 foram mais próximos de 1, sugerindo uma maior correlação entre IL-6 do que IL-1 β frente ao método de referência utilizado na detecção de LPS.

As comparações supracitadas reforçam a importância da validação do sistema sangue total humano/IL-6 com sangue criopreservado para ser inserido em laboratórios biológicos com grande escala de produção industrial, sendo esse sistema mais uma opção de liberação de citocinas.

Os nossos resultados também mostraram que o sangue criopreservado libera maior quantidade de citocinas quando comparado com a liberação no sangue fresco. Esta comparação também foi realizada por Megha e colaboradores (MEGHA *et al*, 2011).

Para que o MAT possa ser um substituto completo para a VFA, estudos complementares com amostras contaminadas artificialmente por outros agentes pirogênicos, como por exemplo, ácido lipoteicóico (LTA), são necessários (GIMENES *et al*, 2015).

7 CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo demonstraram que a VFA não interferiu com a liberação basal de citocinas no modelo MAT, não interferindo, portanto, com a curva dose-resposta.

Tanto as amostras de sangue criopreservado (IL-1 β /IL-6) quanto as amostras de sangue fresco (IL-6) apresentaram valores de liberação de citocina dependentes da concentração do LPS. Em ambos os modelos estudados, os parâmetros para a aceitação da validade foram considerados satisfatórios.

Os sistemas sangue criopreservado (IL-1 β /IL-6) foram considerados mais adequados para análise da VFA que o sistema IL-6/sangue fresco, mas ambos os sistemas confirmaram ausência de LPS nas amostras.

Nas análises inter-ensaios foram observados valores de CV menores para o padrão de LPS e para os lotes de VFA no sistema IL-6/sangue criopreservado, apesar de todos os sistemas apresentarem resultados dentro dos valores preconizados.

O sistema sangue criopreservado/IL-6 foi considerado mais uma opção promissora de liberação de citocinas a ser utilizado nos testes de detecção de contaminantes pirogênicos.

REFERÊNCIAS

BENCHIMOL, JL. Febre amarela: a doença e a vacina, uma história inacabada. Rio de Janeiro: **Editora Fundação Oswaldo Cruz**, 2001.

BOHRER, D., HORNER, R., DO NASCIMENTO, P. C., *et al.* Interference in the limulus amoebocyte lysate assay for endotoxin determination in peritoneal dialysis fluids and concentrates for hemodialysis. **Journal Pharmacological Biomedical Analysis**, v.26, p.811-818, 2001.

BOOTH, C. The Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay: a replacement for the rabbit pyrogen test. **Developments in Biological Standardisation** v.64, p. 271–275, 1986.

BRASIL, Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de vigilância epidemiológica de febre amarela**. Brasília: Ministério da Saúde; p.60, 1999.

CARLIN, G.; VIITANEN, E. In vitro pyrogenicity of a multivalent vaccine: Infanrix. **Pharmeuropa**, v.15, n.3, p.418-423, 2003.

CARVALHO, R. **Controle estatístico de processo da produção da suspensão viral da vacina contra a febre amarela fabricada por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ**; 2005. Dissertação (Mestrado em Imunobiológicos) Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

COELHO, C.A.O. Disponível em:

<http://prismacientifico.wordpress.com/2012/06/16/etica-em-experimentacao-animal-parte-2-os-3-rs/>. Acesso em: 02/06/2014.

COHEN, Y., BAHRI, F., BRUNEAU, J., DUBUIS, M., DUBUIS, N., MERLIN, L., MICHAUD, T. & PEYSSON, S. Detection of endotoxins in radiopharmaceutical preparations. III. Limulus test assessment using radiopharmaceutical preparations; correlation with the rabbit pyrogen test. **International Journal of Nuclear Medicine and Biology**, Elmsford, NY v.12, p.477–481, 1986.

COOPER, J.F. Acceptance of the Limulus test as an alternative pyrogen test for radiopharmaceutical and intrathecal drugs. **Progress in Clinical and Biological Research**. v.29, p.345–352, 1997.

COOPER, J.F., HOCHSTEIN, H.D. & SELIGMANN JR, E.B. The Limulus test for endotoxin (pyrogen) in radiopharmaceuticals and biologicals. **Bulletin of the Parenteral Drug Association** v.26, p.155–162, 1972.

CRANSTON, W. I., LUFF, R. H. the role of noradrenaline in the rabbit brain during pyrogen-induced fever. **Journal Physiology**, v.225, p. 66-67, 1972.

DANESHIAN, M.; Von AULOCK; HARTUNG, T. Assessment of pyrogenic contaminations with validated human whole-blood assay. **Nature Protocols**. v. 4, n.12, p.1709 -1721, 2009.

DINARELLO, C. A. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. **Journal of endotoxin research**. V. 10, n.4, p. 201-222, 2004.

DUFF, G. W. AND ATKINS, E. The detection of endotoxin by in vitro production of endogenous pyrogen: comparison with limulus amebocyte lysate gelation. **Journal Immunology Methods**, v.52, p.323 - 331, 1982.

DUNER, K. I. the importance of the quality of water in limulus Amebocyte lysate tests. PDA. **Journal Pharmacology Science Technology**, v.49, p. 119-121, 1995.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. **Monocyte Activation Test**. General Method 2.6.30. 6th Edition, Suppl. 6.7; 2010.

EXECUTIVE COMMITTEE OF THE CONGRESS. Background to the three Rs declaration of Bologna, as adopted by the 3rd World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Bologna, Italy, on 31 August 1999. In: BALLS, M.; van ZELLER, A.-M; HALDER, M., eda. Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation. Amsterdam: **Elsevier**, p.17-22, 2000.

FARMACOPEIA BRASILEIRA Pirogênios. In: FARMACOPEIA Brasileira. 5 ed. Brasília: **Anvisa**. v.1, p. 229-230, 2010.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4. Ed. São Paulo: **Atheneu**, parte 2, Fascículo 5, 2003.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 3 ed. São Paulo: **Organização Andrei Editoras S.A**, p. 993-994, 1976.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Maisonneuve S .A : Test for pyrogens. **Sainte-Ruffine**, France, v. 2, p.58 – 60, 1971.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 6.th Edition. Pyrogens **Strasbourg**: Concil of Europe, v.1, p. 164-165, 2007.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 7. th Edition. Pyrogens **Strasbourg**: **Concil of Europe**, v.1, p. 161-162, 2011.

FENNRICH, S. *et al.* More than 70 years of pyrogen detection: Current state and future perspectives. **Alternatives to laboratory animals**, v. 44, n.3, p. 239-253, 2016.

FENNRICH, S., Fischer, M., Hartung, T., *et al.* A. Entwicklung und Evaluierung eines Pyrogentests mit menschlichem Blut. **ALTEX** v.15, p.123–128, 1998.

FERREIRA, K. V. *et al.* Histórico da febre amarela no Brasil e a importância da vacinação antiamarílica. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v.36, n.1, p.

40-47, Jan./Abr, 2011.

FLINT, O. A timetable for replacing, reducing and refining animal use with the help of in vitro tests: the Limulus amoebocyte lysate test (LAL) as an example. In *Alternatives to Animal Testing: New Ways in the Biomedical Sciences, Trends and Progress* (ed. C.A. Reinhardt), Weinheim, Germany: **Verlag Chemie**, p 27-43, 1994.

FREITAS, J. C. B. **A Reutilização de coelhos submetidos ao teste de pirogênio com produtos biológicos sujeitos à vigilância sanitária**. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2008.

FUNASA (Fundação Nacional de Saúde) Brasília: Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância Epidemiológica de Febre Amarela**, 1999.

GAGALO, I. T., HAC, E. E., MATUSZEK, M. t., *et al.* Thermoregulatory activity of sodium nitroprusside and arginine vasopressin. **General Pharmacology**, v. 26, p. 393-397, 1995.

GAGALO, I. T., HAC, E. E., KOROLKIEWICZ, K. Z., *et al.* (1996). Do sodium nitroprusside and I-NAME affect pyrogen fever in rabbits? **Acta Physiologica Hungarica**, v. 84, p. 289-290, 1996.

GIMENES I., SILVA C., PRESGRAVE O.A.F, *et al.* Assessment of pyrogenic response of lipoteichoic acid by the monocyte activation test and the rabbit pyrogen test. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 356-360, 2015.

GREISMAN, S. E., HORNICK, R. B. Comparative pyrogenic reactivity of rabbit and man to bacterial endotoxin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.131, p. 1154-1158, 1969.

HANSEN, E. W. *et al.* Comparison of cultured human mononuclear cells, Limulus amoebocyte lysate and rabbits in the detection of pyrogens. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 15, n.6, p. 425-33, 1990. doi:10.1111/j.1365- 2710, 1990.

HARMON, P., CABRAL-LILLY, D., REED, R. A., *et al.* the release and detection of endotoxin from liposomes. **Analytical Biochemistry**, v. 250, p.139-146, 1997.

HARTUNG T. The human whole blood pyrogen test – lessons learned in twenty years. **ALTEX**, v.32, n.2, p.79-100, 2015.

HARTUNG, T. *et al.* Novel pyrogen tests based on the human fever reaction. **ATLA**, v. 29, p. 99-123, 2001.

HARTUNG, T., FENNRICH, S., FISCHER, M. *et al.* Prevalidation of an alternative to rabbit pyrogen test based on human whole blood. In: Balls M, van Zeller A.-M, Halder M E (Eds). *Progress in the Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experimentation*. **Elsevier Science**, Amsterdam, 2000.

HARTUNG, T.; WENDEL, A. Detection of pyrogens using human whole blood. **In vitro Toxicology**, v. 9, n.4, p. 353-359, 1996.

HARTUNG, T.; WENDEL, A. Die erfassung von pyrogenen in einem humanen vollblutmodell. **ALTEX**, v. 12, n. 2, p. 70-75, 1995

HASIWA, N. *et al.* Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test. **ALTEX**, 30:p. 169-208, 2013.

HOFFMANN, S. *et al.* Optimization of testing in parenterals according to different pharmacopeias by probabilistic modeling. **Journal of Endotoxin Research**, v. 11, p. 25-31, 2005.

HOCHSTEIN, H. D; MUNSON, T. E; OUTSCHOORN, A. S. Comparison of rabbit responses of two E. coli endotoxin preparations in the FA rabbit pyrogen test. **Pharmacopeial Forum**, p. 346-351, 1990.

HOFFMANN, S. *et al.* Internatioanal Validation of novel pyrogen tests based on human monocytoid cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 298, p.161-173, 2005.

HOMMA, A. **Desenvolvimento e Produção da Vacina contra a Febre Amarela no Brasil**. In: Anais das Perspectivas Tecnológicas em Saúde: os desafios da leishmaniose e da febre amarela, 10 e 11 de maio de 2001. Rio de Janeiro, Brasil. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz: p.108 - 124; 2002.

<http://eadm.news/2016-01-31-14-12-27/dwelling-inside-uganda-s-forest-where-the-zika-virus-originated>. Acesso em 31/03/2016.

<http://oglobo.globo.com/sociedade/historia/oswaldo-cruz-homem-que-venceu-aedes-18226566>. Acesso em 31/03/2016.

ICCVAM. Validation status of five in vitro test methods proposed for assessing potential pyrogenicity of pharmaceuticals and other products. ICCVAM test method evaluation report. **NIH**, n. 8, p. 6392, 2008.

INCQS. **Atividades institucionais**, Rio de Janeiro: Fiocruz, 2005.

INCQS. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2005. www.incqs.fiocruz.br. Acesso em: 02/06/2014.

KINDINGER, I. *et al.* A new method to measure air-borne pyrogens based on human whole blood cytokine response. **Journal of Immunological Methods**; v. 298, n.1-2, p.143-53, 2005.

KORYAKINA, A.; FREY, E.; BRUEGGER, P. Cryopreservation of human monocytes for pharmacopeial monocyte activation test. **Journal Immunological Methods**; v. 405, p.181-91, 2014.

KRÜGER, D. Der Pyrogennachweis mittels des Limulustests — Methoden, Ergebnisse, Möglichkeiten und Grenzen eines In-vitro-Tests. **Die Pharmazeutische Industrie**, v.43, p. 1–8, 1981.

LAUDE-SHARP, M. *et al.* Dissociation between the interleukin 1-inducing capacity and Limulus reactivity of lipopolysaccharides from gram-negative bacteria. **Cytokines** v.2, n.4, p.253-8, 1990.

LEVIN, J. AND BANG, F. B. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of limulus blood. **Bulletin of the Johns Hopkins Hospital**, v.115, p.265-274, 1964.

MARKETS & MARKETS, Pyrogen Testing Market by Product (Instruments, Services, Kits & Reagents), by Test (In Vitro, LAL, Rabbit Test), by Application (Pharmaceutical & Biotechnology Companies, Medical Devices, Other Applications) - Global Forecast to 2019, 2015. <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/pyrogen-testing-market-255266155.html>. Acessado em 05/04/2016.

MCCLOSKEY, W.T.; PRICE, W.T.; VAN WINKLE, W.J. *et al.* Results of the first USP collaborative study of pyrogens. **Journal of the American Pharmacists Association**, v.32, n.3, p.69-73, 1943.

MEGHA, K. B.; SIDDHARTH BANERJEE, MOHANAN P.V. Investigation of interleukin1b release from cryopreserved blood stimulated with endotoxin. **Cryobiology**, v. 63, p. 273– 278, 2011.

MELANDRI, V. C. R. *et al.* Utilização de métodos alternativos na determinação da contaminação pirogênica no controle de produtos injetáveis sujeitos à vigilância sanitária. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 8, n. 2, p. 69-95, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Febre amarela: histórico** [on line]. Brasília, Brasil; Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/febreamarela/historico.php> Acesso em 20 de outubro de 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Febre amarela: histórico**. Brasília, Brasil; 2014. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/febreamarela/historico.php> Acessado em 17 outubro de 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota técnica informativa**, n. 102 CGPNI/DEVIT/SVS/MS 26/08/14, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil. Portal Saúde. 2015. Esclarecimento sobre suspeita de febre amarela no RN. Data de Cadastro: 30/12/2015: <http://portal.saude.gov.br/portal/default.cfm>. Acesso em 01/4/2016

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil. Portal Saúde. 2016. Situação epidemiológica da febre amarela e recomendações para intensificar a vigilância no Brasil: <http://portal.saude.gov.br/portal/default.cfm>. Acesso em 01/4/2016.

MONATH, T.P. Yellow fever vaccine. Review. **Expert Review Vaccines**; v.4, n. 1, p.22, 2005.

MONTAG-LESSING, T., SPREITZER, I., LÖSCHNER, B. *et al.* Safety testing of cell-based medicinal products: opportunities for the monocyte activation test for pyrogens. **ALTEX** v.24, p. 81-89, 2007.

MORATH, S., *et al.* T. Structural Decomposition and Heterogeneity of Commercial Lipoteichoic Acid Preparations. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 938–944, 2002.

MS (Ministério da Saúde). **Descrição da doença febre amarela**. Brasília, Brasil; 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/427-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/febre-amarela/11-febre-amarela/10702-descricao-da-doenca-febre-amarela> Acesso em 22 de outubro de 2014.

NAVEGA, E. C. A., DA SILVA, C. C., PRESGRAVE, O. F., ALMEIDA, A. S., DELGADO, I. F., & DE MATTOS, K. A. Métodos alternativos ao uso de animais para a detecção de pirogênio: oportunidades e desafios no controle da qualidade de produtos biológicos. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, n. 4, p. 71-81, 2015.

NETTO E.J.R. *et al.* **Avaliação do controle da qualidade das vacinas contra febre amarela analisadas no instituto nacional de controle de qualidade em saúde no período de 2000 a 2008**. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2010.

NETTO, Eduardo; FRIEDRICH, K.; Leandro, K; DELGADO, I. F. Controle da qualidade de vacinas contra febre amarela utilizadas no Programa Nacional de Imunizações do Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** (Impresso), v. 70, p. 606- 612, 2011.

NYERGES, G.; JASZOVSKY, I. Reliability of the rabbit pyrogen test and of the limulus test in predicting the pyrogenicity of vaccines in man. **Acta microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v.28, n.3, p.235-243, 1981.

OCHIAI, M.; YAMAMOTO, A.; KATAOKA, M. *et al.* Interfering effect of diphtheria et na use acellular pertussis combined (DTaP). Vaccines on the bacterial endotoxin test. **Biologicals**, v.29, n.1, p.55-58, 2001.

PARK, C.Y.; JUNG, S.H.; BAK, J.P. *et al.* Comparison of the rabbit pyrogen test and Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay for endotoxin in hepatitis B vaccines and the effect of aluminum hydroxide. **Biologicals**, v.33, n.3, p.145-151, 2005.

PERDOMO-MORALES, R. *et al.*; Monocyte activation test (MAT) reliably detects pyrogens in parenteral formulations of human serum albumin, **ALTEX**, v.28, n.3: p. 227- 235, 2011.

PINTO, T. J. A. *et al.* **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

POOLE, S. *et al.* A rapid 'one-plate' in vitro test for pyrogens. **Journal of Immunological methods**. V. 274, n. 1-2, p. 209-220, 2003.

POOLE, S.; GAINES DAS, R.E. Towards a 'human pyrogen test'. **European Journal of Parenteral Sciences**. v. 6, Special no, p.63-64, 2001.

POOLE, S. *et al*, Detection of pyrogen by cytokine release. **Lancet**, v. 8577, p. 130, 1988.

POST, PR. **Biologia molecular do vírus da febre amarela**. DSc Thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, p. 104,1996.

PRESGRAVE, O. A. F. *et al*. The use of cytokine release (whole blood assay) for detecting pyrogens in anti-venom sera. Abstracts of the 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences; 2009 AUG 21-25; Berlim, Germany. **ALTEX**, v. 22, p. 221, 2009.

PRESGRAVE, O. A. F. **Liberção de citocinas como método alternativo ao ensaio de pirogênio em coelhos no controle de qualidade de produtos injetáveis**. 2003. Dissertação (Mestrado) - Fiocruz, Rio de Janeiro, 2003.

PROBEY, T. F., PITTMAN, M. The pyrogenicity of bacterial contaminants found in biologic products. **Journal Bacteriology**, v.50, p. 397-411, 1945.

RENAMA (Rede Nacional de Métodos Alternativos). **Métodos alternativos**. Brasil; 2016. Disponível em: http://renama.org.br/?page_id=109. Acesso em: 05/04/2016.

ROSLANSKY, P. F., NOVITSKY, T. J. Sensitivity of limulus amebocyte lysate (IAL) to IAL-reactive glucans. **Journal Clinical Microbiology**, 29, 2477-2483, 1991.

ROSS, V. C., BRUCH, C. W. endotoxin testing of medical devices with IAL: FDA requirements. **Progress in Clinical Biological Research**, v. 93, p. 39-48, 1982.

SCHINDLER, S. *et al*. Cryopreservation of human whole blood por pyrogenicity testing. **Journal of Immunological Methods**, v.294,p.89- 100,2004.

SCHINDLER, S. *et al*. Development, validation and applcations of the monocyte activation test for pyrogens based on human whole blood. **ALTEX**, [S.I.], v. 26, p. 265-277, 2009.

SCHINDLER, S. *et al*. International validation of pyrogen tests based on cryopreserved human primary blood cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 316, p. 42-51, 2006. SILVA, C. *et al*. The use of Mono Mac 6 cells as indicators of endotoxin contamination in the quality control of injectable products. **ALTEX**, v. 22, Special Issue, p. 213, 2005.

SILVA, C.; CRUZ, M.; FREITAS, J. *et al*. Aplicabilidade do Teste de Ativação de Monócitos (MAT) no Brasil: importância da sua utilização como teste para detecção de pirogênios no controle da qualidade de produtos injetáveis. **Visa em Debate**, 2015a.

SILVA, C. **Avaliação da contaminação pirogênica em soros hiperimunes e ambientes sujeitos a vigilância sanitária: comparação dos métodos in vitro e in**

vivo aplicados ao controle da qualidade; 2015. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015b.

SILVA, C., PRESGRAVE, O. HARTUNG,T., *et al.* Applicability of the Monocyte Activation Test (MAT) for hyperimmune sera in the routine of the quality control laboratory: Comparison with the Rabbit Pyrogen Test (RPT). *Toxicology in vitro*.**Elsevier**, v.32, p. 70-75, 2016.

SMULDERS, S., KAISER, J. P., ZUIN, S., *et al.* Contamination of nanoparticles by endotoxin: evaluation of different test methods. **Particle and Fibre Toxicology**, v.9, p.41, 2012.

STODDARD, M. B., PINTO, V., KEISER, P. B., AND ZOLLINGER, W. Evaluation of a whole-blood cytokine release assay for use in measuring endotoxin activity of group B Neisseria meningitidis vaccines made from lipid A acylation mutants. **Clinical Vaccine Immunological**. , v. 17,p. 98-107, 2010.

TAKTAK, Y. S. *et al.* Assay of pyrogens by interleukin-6 release from monocytic cell lines. **Journal of Pharmacy Pharmacology**; v.43, p.578-582, 1991.

van MIERT, A. S., van DUIN, C. t. Further studies on the antipyretic action of polymyxin B in pyrogen-induced fever. **Arzneimittelforschung**, v.28, p. 2246-2251, 1978.

van ZELLER, A.-M; HALDER, M.,*eda.* Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation. Amsterdam: **Elsevier**, p. 17-22, 2000.

VIPOND, C.; FINDLAY, L. *et al.* Limitations of the Rabbit Pyrogen Test for Assessing Meningococcal OMV Based Vaccines. **ALTEX**, v. 33, n.1, p. 47-53.

WELSH, H.; CALVERY, H.O.; MCCLOSKEY W.T. *et al.* Method of Preparation and Test for Bacterial Pyrogen. **Journal of the American Pharmacists Association**. v.32, n.3, p.65-69, 1943.

WHO – World Health Organization. **Progress in the control of yellow fever**. Weekly Epidemiological Record, v.80, p. 50-54, 2005.

WILLIAMS, L. K. Endotoxins. **Pyrogens, LAL testing and depyrogenation**. 2. Ed. New York: Marcel Dekker, 2007.

WUNDERLICH *et al.* Pyrogen detection methods: comparison of bovine whole blood assay (bWBA) and monocyte activation test (MAT). **BMC Pharmacology and Toxicology**, 15:50, 2014.

WUNDERLICH, C.; SCHUMACHER, S.; KIETZMANN, M. Pyrogen detection methods: Comparison of bovine whole blood assay (bWBA) and monocyte activation test (MAT). **BMC Pharmacology and Toxicology**, v.15, p.50-57, 2014.

ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. *et al.* Establishment of a human cell line. (Mono Mac

6) with characteristics of mature monocytes. **International Journal of Cancer**, v. 41, n. 3, p. 456-61, 1988.