

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

Jéssica Ferreira de Souza Freitas

**PADRONIZAÇÃO DE SORO ANTIRRÁBICO DE REFERÊNCIA UTILIZANDO O  
ENSAIO DE VIRUSNEUTRALIZAÇÃO EM CÉLULAS BHK-21**

Rio de Janeiro

2019

Jéssica Ferreira de Souza Freitas

**PADRONIZAÇÃO DE SORO ANTIRRÁBICO DE REFERÊNCIA UTILIZANDO O  
ENSAIO DE VIRUSNEUTRALIZAÇÃO EM CÉLULAS BHK-21**

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Tutor: Wlamir Corrêa de Moura  
Preceptor: Wildeberg Cal Moreira

Rio de Janeiro

2019

## Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Freitas, Jéssica

PADRONIZAÇÃO DE SORO ANTIRRÁBICO DE REFERÊNCIA  
O UTILIZANDO O ENSAIO DE VIRUSNEUTRALIZAÇÃO EM  
CÉLULAS BHK-21. / Jéssica Freitas. - Rio de Janeiro:  
INCQS/FIOCRUZ, 2019.

43 f. : fig. ; graf. ; tab.

Monografia (Programa de Residência Multiprofissional em Saúde  
na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de  
Produtos, Ambientes e Serviços) - Programa de Pós-Graduação em  
Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em  
Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

Tutor: Wlamir Moura. Preceptor:  
Wildeberg Moreira.

1. Raiva. 2. Potência. 3. Padronização. I. Título.

STANDARTIZATION OF ANTIRABIES SERUM REFERENCE USING  
VIRUS NEUTRALIZATION TEST IN BHK-21 CELLS.

Jéssica Ferreira de Souza Freitas

**PADRONIZAÇÃO DE SORO ANTIRRÁBICO DE REFERÊNCIA O UTILIZANDO O  
ENSAIO DE VIRUSNEUTRALIZAÇÃO EM CÉLULAS BHK-21**

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

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

BANCA EXAMINADORA

---

Renata Faria de Carvalho (Mestre)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

---

Lucia Maria Correa Werneck (Doutora)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

---

Wildeberg Cal Moreira (Doutor) - Preceptor

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

---

Wlamir Corrêa de Moura (Doutor) - Tutor

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Dedico....

Aos meus pais Adonias e Eloisa

Ao meu querido marido Rennan.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por estar comigo em todos os momentos.

Aos meus pais, Adonias José de Freitas e Eloisa Ferreira de Souza Freitas, por todo amor e pelos ensinamentos ao longo da vida.

Ao meu marido, Rennan Lofrano dos Reis Souza, por todo amor, carinho e paciência.

Ao meu irmão, Marcos Vinicius Freitas, pelo companheirismo.

A minha avó, Odelina Souza, pela dedicação durante toda vida.

Ao meu tutor, Dr. Wlamir Côrrea de Moura, pela orientação, pelos conhecimentos compartilhados e pelo incentivo nos momentos de desânimo.

Ao meu preceptor, Dr. Wildeberg Cal Moreira, pelo conhecimento transmitido, por toda ajuda e compreensão.

Aos colegas de trabalho, Nathália Machado, Ivani Cutis e Dejaildo Silva, pelo auxílio nos ensaios e pela ótima companhia diária.

Ma. Anna Christina Guimarães, por toda a ajuda dispensada.

Aos amigos da turma da Residência, pelos momentos compartilhados e pela amizade. Em especial as amigas: Gabriella Pires, Thais Su, Raphaela Franco e Yasmin Rosa pela amizade que construímos.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária.

Aos funcionários do Departamento de Imunologia (INCQS / Fiocruz).

E a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

José de Alencar

## RESUMO

Um lote de soro antirrábico foi produzido na forma liofilizada pelo Instituto Butantan (São Paulo – BR) e doado ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz - Rio de Janeiro – BR) como candidato para estabelecimento de um novo padrão nacional de referência. O presente estudo foi desenvolvido para padronizar a potência virusneutralizante do lote candidato para o vírus rábico, utilizando cultivo de células. O teste utilizado para determinar a potência do soro foi o Ensaio de Potencia de Neutralização Viral (EPNV) em células BHK-21 em placas de 96 poços. Foram realizados quatro ensaios em dias diferentes. Os soros candidatos foram testados frente ao 2º padrão internacional de imunoglobulina antirrábica (NIBSC – UK), todos diluídos para conter aproximadamente 1 UI/mL, em quatro diluições cada e em três replicatas. Os resultados foram calculados utilizando o *software* CombiStats do *European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare* (EDQM) para obtenção da dose efetiva 50% (DE<sub>50</sub>) e da potência em unidades internacionais (UI/frasco). Os resultados foram combinados para obtenção da média semi ponderada que foi considerada o título do produto.

**Palavras-Chave:** Raiva. Potência. Neutralização.

## **ABSTRACT**

A batch of rabies antiserum was produced in the lyophilized form by the Butantan Institute and donated to the National Institute of Quality Control in Health (INCQS / Fiocruz - Rio de Janeiro – BR) as a candidate for establishment as a new national reference standard. The present study was conducted to standardize the batch using virus-neutralizing potency test in cell culture. The test used for potency determination was the Virus Neutralization Potency Assay (VNPA) in BHK-21 cells in 96-well plates. Four assays were performed on different days. The candidate serum was tested against the 2<sup>nd</sup> International Standard of rabies Immunoglobulin (NIBSC - UK), all diluted to contain approximately 1 IU/mL, in four dilutions each and in three replicates. The results were calculated using the CombiStats software from the European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM) to obtain the effective dose 50% (ED<sub>50</sub>) and the potency in international units (IU/vial). The results were combined to obtain the mean that was considered the title of the candidate.

Key words: Rabies. Potency. Neutralization.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Vírus rábico.....	14
Figura 2 - Taxa de mortalidade de raiva humana por tipo de animal agressor (1986-2018).....	17
Figura 3 - Esquema de placa para Ensaio de Potência de Neutralização Viral.....	30
Figura 4 - Intervalos de confiança das médias das potências de cada ensaio para o lote BR011. Da esquerda para a direita: Ensaio 1, 2, 3 e 4. ....	34
Figura 5 - Intervalos de confiança das médias das potências de cada ensaio para o lote BR015. Da esquerda para a direita: Ensaio 1, 2, 3 e 4. ....	34
Figura 6 - Gráfico de Controle da Imunoglobulina de Referência Internacional utilizado na rotina do laboratório. ....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genótipos do gênero <i>Lyssavirus</i> .....	13
Tabela 2 - Variantes antigênicas do vírus rábico identificadas no Brasil.....	15
Tabela 3 - Títulos em UI/frasco obtidos por ensaios EPNV para os soros de lote BR011 e BR015. ....	33
Tabela 4 – Novos títulos em UI/frasco obtidos por ensaios EPNV para os soros de lote BR011 e BR015.....	35
Tabela 5 - Título final para os soros BR011 e BR015 em UI/frasco. ....	35
Tabela 6 - Dose efetiva 50% (DE <sub>50</sub> ) da Imunoglobulina de Referência Internacional, soros lote BR011 e BR015.....	36
Tabela 7 - Título do Vírus Trabalho, expresso em DFF <sub>50</sub> .....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AgV – Variante genética do vírus rábico
- AgV1 – Variante genética compatível com cão doméstico n 1
- AgV2 - Variante genética compatível com cão doméstico n 2
- AgV2\* - Variante genética compatível com *Cerdocyon thous*
- AgV3 – Variante genética compatível com *Desmodus rotundus*
- AgV4 – Variante genética compatível com *Tadarida brasiliensis*
- AgV6 – Variante genética compatível com *Lasiurus spp*
- AgVNC – Variante genética compatível com *Callithrix jacchus*
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- CC – Controle de células
- BHK-21 - *Baby Hamster Kidney*
- CCL – *Certified Cell Line*
- CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*
- CO<sub>2</sub> – Gás carbônico
- CV – Coeficiente de variação
- CVS - *Challenge Virus Standard*
- DE<sub>50</sub> - Dose efetiva 50%
- DI – Departamento de Imunologia
- DIFF<sub>50</sub> – Dose Inibidora de Focos Fluorescentes
- DFF<sub>50</sub> – Dose Formadora de Focos Fluorescentes
- DV – Desvio padrão
- EBLV-1 - *European Bat Lyssavirus* tipo 1
- EBLV-2 - *European Bat Lyssavirus* tipo 2
- EDQM - *European Directorate for the Quality of Medicines*
- EPNV – Ensaio de Potência de Neutralização Viral
- F(ab')<sub>2</sub> - *Fragment antigen-binding*
- FDA - *Food and Drug Administration*
- Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz
- ID - Intradérmica
- IgAR - Imunoglobulinas Antirrábicas
- IM – Intramuscular

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
IR – Imunoglobulina de Referência Internacional  
K-s - Kolmogorov-smirnov  
LCR - Líquido Cefalorraquidiano  
LVV – Laboratório de Vacinas Virais  
NIBSC - *National Institute of Biological Standards and Control*  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde  
p – p valor de homogeneidade  
PBS - *Phosphate Buffered Saline*  
Ph. Br. – Farmacopeia Brasileira  
Ph. Eur. - Farmacopeia Europeia  
POP – Procedimento Operacional Padrão  
PM – Peso Molecular  
PNI – Programa Nacional de Imunizações  
PNPR - Programa Nacional de Profilaxia da Raiva Humana  
RABV – Vírus rábico  
RDC – Resolução de Diretoria Colegiada  
RFFIT - Teste de Rápida Inibição de Focos Fluorescentes  
RNA – Ácido ribonucleico  
SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SR – Soro Referência  
ST – Soro Teste  
UI – Unidade Internacional  
VT – Vírus Trabalho

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1 O vírus .....	13
1.2 Epidemiologia .....	16
1.3 Patogenia e sinais clínicos .....	18
1.4 Imunobiológicos para raiva .....	19
1.5 Controle da qualidade .....	22
1.6 Determinação da potência em soro antirrábico .....	23
1.6.1 Vírusneutralização em camundongos .....	23
1.6.2 Vírusneutralização em células BHK-21 .....	23
1.7 Padrão de referência biológico .....	24
1.8 Potência relativa .....	25
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>26</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
3.1 Objetivo geral .....	27
3.2 Objetivos específicos .....	27
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
4.1 Soros .....	28
4.1.1 Soro teste (ST) .....	28
4.1.2 Soro Antirrábico de Referência Nacional .....	28
4.2 Ensaio sorológico para determinação de potência .....	28
4.2.1 Cultura de células .....	28
4.2.2 Cepa viral .....	29
4.2.3 Imunoglobulina de Referência Internacional (IR) .....	29
4.2.4 Ensaio de Potência de Neutralização Viral .....	29
4.2.5 Teste de imunofluorescência direta .....	30
4.3 Análise estatística .....	31
4.4 Média da potência dos soros teste .....	31
4.5 Critérios para aceitação do ensaio .....	31
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>40</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O vírus

O vírus rábico (RABV) pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*. Atualmente é subdividido em 11 genótipos (Tabela 1), todos são conhecidos e suspeitos de causar doenças semelhantes a raiva. O responsável por causar a raiva humana é o genótipo 1, protótipo do gênero (HATZ; KUENZIL; FUNK, 2012).

Tabela 1 - Genótipos do gênero *Lyssavirus*.

GENÓTIPO	VÍRUS	IDENTIFICADO EM	PRINCIPAL HOSPEDEIRO
1	RABV*	Todo o mundo	Cão e morcego
2	Lagos	África	Morcego
3	Mokola	Nigéria	Morcego
4	Duvenhage	África	Morcego
5	EBLV-1**	Europa	Morcego
6	EBLV-2**	Europa	Morcego
7	Australian bat	Austrália	Morcego
8	Aravan	Quirguistão	Morcego
9	Khujand	Tajiquistão	Morcego
10	Irkut	Ásia	Morcego
11	West Caucasian bat vírus	Europa Oriental	Morcego

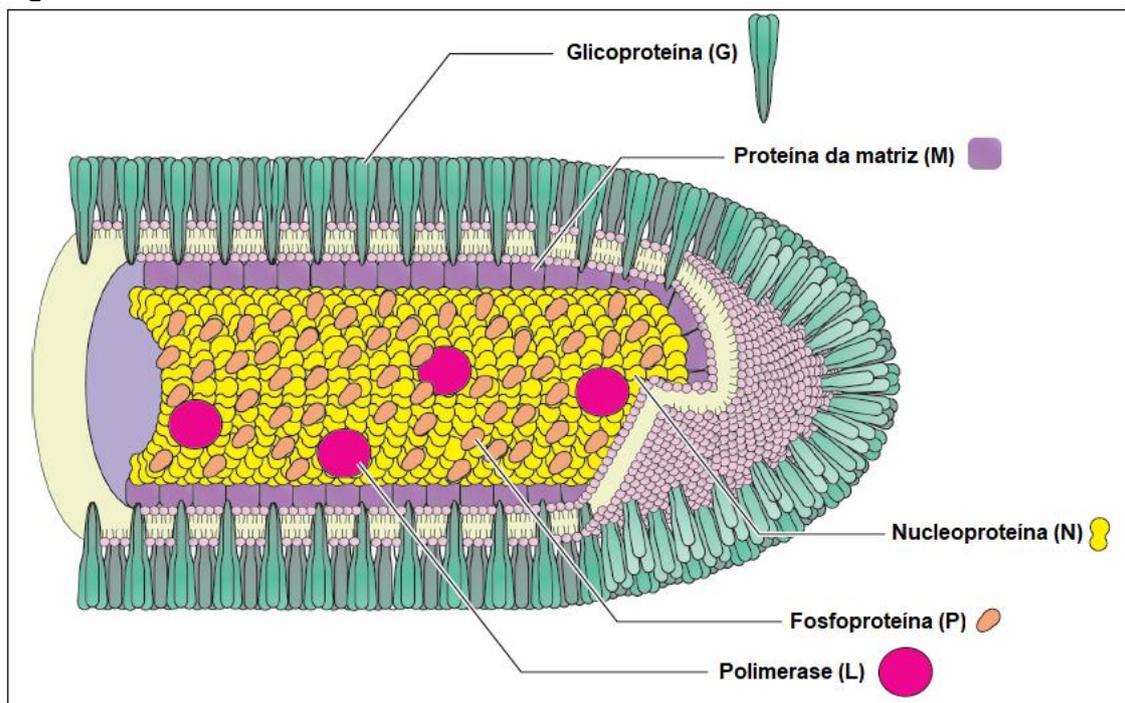
\* Vírus da Raiva \*\*European Bat Lyssavirus.

Fonte: (Adaptado de HATZ; KUENZIL; FUNK, 2012).

O RABV é envelopado, sendo sensível a detergentes e solventes lipídicos. É inativado por luz solar, calor e dessecação (YOUSAF *et al.*, 2012). O vírion possui diâmetro de aproximadamente 75 nm, comprimento entre 100 e 300 nm e formato característico de projétil. Este apresenta-se como um cilindro constituído pelo genoma e envolto pela nucleoproteína (proteína N), formando um nucleocapsídeo helicoidal (BATISTA, 2007).

Todos os *Lyssavirus*, vírus rábicos ou aparentados, possuem ácido ribonucleico (RNA) de fita simples, polaridade negativa, linear, não segmentado, com 11.932 nucleotídeos e peso molecular (PM) =  $4,6 \times 10^6$  Quilodaltons (BRASIL, 2008a). O genoma codifica cinco proteínas, são elas: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P antes M1), proteína da matriz (M antes M2), glicoproteína (G) e a RNA polimerase (L) (Figura 1) (DAVIS; RALL; SCHNELL, 2015).

Figura 1 - Vírus rábico.



Fonte: (Adaptado de DAVIS; RALL; SCHNELL, 2015).

A glicoproteína G (525 aminoácidos, 65-70 KDa) é expressa na superfície viral, sendo considerada a mais importante, visto que é responsável pela patogenicidade viral e por promover a indução de anticorpos neutralizantes, induzindo imunidade protetora contra raiva. Ela também promove adsorção do vírus à célula hospedeira e fusão do envelope à membrana citoplasmática. Estimula, juntamente com as proteínas N e P, células T auxiliares e citotóxicas, uma resposta imune celular e participa do processo de brotamento de novos vírions (SINGH, 2017).

A proteína N (450 aminoácidos, 58-62 KDa), forma o capsídeo e protege o RNA viral da ação das ribonucleases. Além disso, auxilia na regulação da

transcrição do RNA viral. Essa proteína apresenta epítomos para o reconhecimento de linfócitos T, sendo um antígeno grupo-específico (ACHA; SZYFRES, 2003).

A proteína L (2128 aminoácidos, 190KDa) é uma subunidade do complexo que forma a RNA polimerase. Forma o conglomerado que transcreve o genoma viral, juntamente com as proteínas P e N. Por sua vez, a proteína P (298 aminoácidos, 35-40 KDa) está associada ao ribonucleocapsídeo e interage com a proteína L. Por fim, a proteína M (203 aminoácidos, 22-25 KDa) promove a montagem das partículas (ICTV, 2018).

O RABV é considerado bastante estável, entretanto apresenta algumas variações antigênicas, que servem como marcadores epidemiológicos, permitindo a identificação da espécie fonte da infecção ou de variantes associadas a determinados nichos ecológicos (BRASIL, 2008a). As variantes antigênicas do vírus rábico (AgV) foram caracterizadas a partir de isolados do vírus por um painel estabelecido pelo *Center for Disease Control* (CDC) e Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). No Brasil foram identificadas as seguintes variantes: 1 (AgV1) e 2 (AgV2), próprias dos cães (*Canis familiaris*); 3 (AgV3), do morcego hematófago *Desmodus rotundus*; 4 (AgV4), própria do morcego insetívoro *Tadarida brasiliensis*; 6 (AgV6), do morcego insetívoro *Lasiurus cinereus*, AgV2\* isolada da espécie *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato) e AgVCN, que tem como reservatório a espécie *Callithrix jacchus* (sagui-de-tufo-branco) (Tabela 2) (ROCHA, 2014; BRASIL, 2016).

Tabela 2 - Variantes antigênicas do vírus rábico identificadas no Brasil.

<b>Variante antigênica</b>	<b>Espécie</b>
AgV1	<i>Canis familiaris</i>
AgV2	<i>Canis familiaris</i>
AgV3	<i>Desmodus rotundus</i>
AgV4	<i>Tadarida brasiliensis</i>
AgV6	<i>Lasiurus cinereus</i>
AgV2*	<i>Cerdocyon thous</i>
AgVCN	<i>Callithrix jacchus</i>

AgV – variantes antigênicas do vírus rábico, AgV2\* - variante antigênica do vírus rábico isolada da espécie *Cerdocyon thous*.

Fonte: (Do autor, 2019).

## 1.2 Epidemiologia

A raiva ocorre em todos os continentes, com exceção da Antártida, sendo endêmica na maioria dos países asiáticos e africanos. Estima-se que ocorram 59.000 óbitos por raiva anualmente, sendo que 95% das mortes se concentram em países da Ásia e África. Estimativas indicam que a mortalidade humana é maior na Ásia, sendo a maior incidência na Índia. Nesses dois continentes, 40% das mortes por raiva ocorrem em crianças menores de 15 anos. Nas regiões endêmicas, 90% dos casos de raiva humana ocorrem devido a transmissão por cães (OMS, 2018a).

Estima-se que o gasto anual dos países em desenvolvimento com profilaxia pós-exposição para raiva seja de US\$ 560 milhões. Entretanto três intervenções podem ser realizadas para diminuir os casos de raiva humana. Uma delas consiste na conscientização sobre a doença, promovendo educação em saúde, levando as pessoas a buscarem os cuidados que necessitam. Outra medida importante é a vacinação em massa de cães, interrompendo a transmissão da raiva. E por fim, o acesso imediato e adequado à profilaxia pós-exposição no caso de suspeita de exposição (OMS, 2018b).

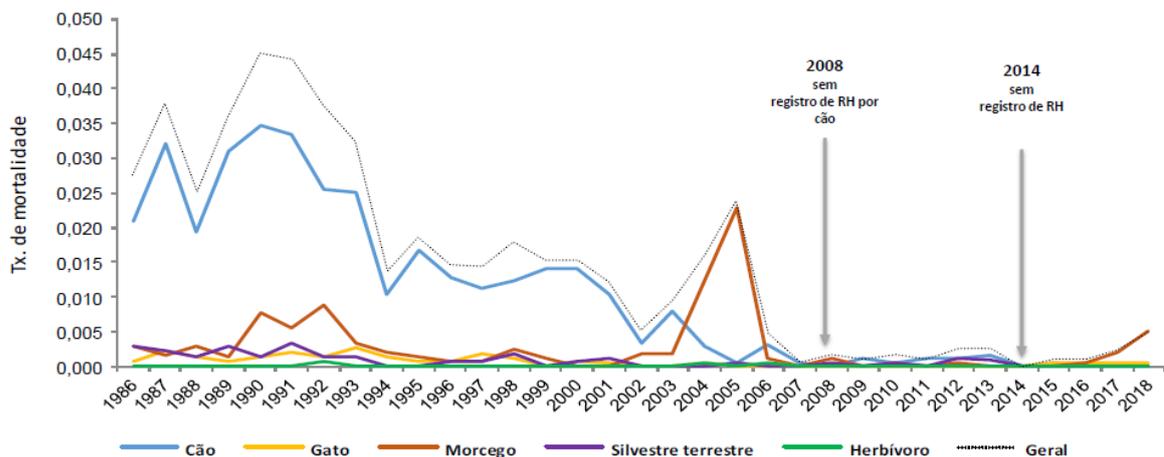
No Brasil, foi instituído em 1973 o Programa Nacional de Profilaxia da Raiva Humana (PNPR), tendo como principal objetivo a redução no número de casos de raiva humana, por meio do controle em animais domésticos (vacinação), aplicação do esquema de profilaxia de pré e pós-exposição e educação em saúde. Já em 1983, foi desenvolvido o “Plano de Ação para Eliminação da Raiva Urbana das Principais Cidades da América Latina” pela OPAS, com o objetivo de eliminar a raiva humana transmitida por cães na América até o final da década de 80 (WADA; ROCHA; ELKHOURY, 2011).

A notificação de todo caso suspeito de raiva é compulsória e imediata nos níveis municipal, estadual e federal em todo o território nacional. O Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) possui uma ficha padronizada, fundamental para a investigação do caso e decisão da conduta de profilaxia que deve ser adotada (BRASIL, 2010a).

A partir da evolução desses programas houve redução significativa de mortalidade por raiva humana, visto que ocorreu a intensificação das ações de vigilância e controle de raiva canina e felina, o que é demonstrado na Figura 2. No período de 1990 a 2009 foram registrados 574 casos de raiva humana no Brasil,

onde até 2003 a principal espécie agressora foi o cão. Em 2004 o maior agressor passou a ser o morcego (BRASIL, 2014a).

Figura 2 - Taxa de mortalidade de raiva humana por tipo de animal agressor (1986-2018).



Fonte: SVS/MS. (<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/raiva/situacao-epidemiologica>).

De 2010 a 2018, foram registrados 36 casos de raiva humana no Brasil. Desses casos, nove foram provocados por agressão de cães, 19 por morcegos, quatro por primatas não humanos, três por felinos e em um deles não foi possível identificar o animal agressor (BRASIL, 2018a).

Em 2017 seis casos de raiva humana foram registrados, todos pela variante 3 de morcegos hematófagos. Em cinco casos ocorreu agressão direta de morcegos, três deles no Amazonas e os outros dois na Bahia e Tocantins. O sexto caso aconteceu em Pernambuco devido a agressão de um gato de rua infectado com a variante 3, própria do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (BRASIL, 2018a).

Em 2018 foram registrados 11 casos de raiva humana no Brasil. Desses, 10 estavam relacionados com um surto em região ribeirinha de Melgaço, no Pará, onde todos apresentaram histórico de espoliação por morcegos e não realizaram profilaxia antirrábica pós-exposição. E um caso foi de um homem morador do Paraná, que foi espoliado por um morcego em Ubatuba, São Paulo, e procurou a profilaxia 12 dias após a exposição (BRASIL, 2018a).

### 1.3 Patogenia e sinais clínicos

Todos os mamíferos são susceptíveis e capazes de transmitir o RABV, mas os principais reservatórios são os mamíferos carnívoros (em sua maior parte cães) e morcegos. A transmissão ocorre principalmente por meio da mordedura de animais infectados, onde a saliva com o vírus penetra na pele. A estimativa é que 60 a 75% dos cães raivosos eliminam o vírus na saliva, e a quantidade pode variar de vestígios a títulos altos (ACHA; SZYFRES, 2003).

Embora seja pouco frequente, o vírus também pode ser transmitido pela exposição de ferida, ou membrana mucosa, à saliva de um animal infectado. A transmissão por inalação pode ocorrer em cavernas onde a densidade de morcegos é alta e a ventilação mínima (WEANT; BAKER, 2013). Ocasionalmente a transmissão pode ocorrer em transplantes de órgãos como córnea. Em 2004 foram divulgados dois casos, em um deles o RABV foi transmitido a quatro receptores de transplante de um doador infectado no Texas e no outro, três receptores de um doador da Alemanha foram contaminados. Todos que receberam os órgãos foram a óbito (NIGG; WALKER, 2009).

O período de incubação é muito variável e depende de uma série de fatores, como: o local da mordedura (a incubação costuma ser mais longa quando a mordedura é distante do Sistema Nervoso Central - SNC), a carga viral no momento da agressão, a variante do vírus e a imunidade de quem sofreu a agressão. No homem, o período de incubação dura, geralmente, de dois a três meses, podendo ser mais curto ou longo (SINGH et al, 2017).

Depois de inoculado por via subcutânea ou intramuscular, o RABV se replica nos miócitos próximos a mordedura e se propaga por nervos periféricos até o SNC e, em seguida, dentro do SNC, por transporte axonal. Depois do desenvolvimento da infecção no SNC, o vírus se difunde de forma centrífuga pelos nervos eferentes até os órgãos e tecidos (JACKSON, 2013).

No homem a doença começa com a fase prodrômica, apresentando sintomas inespecíficos, como: irritabilidade, cefaleia, mal-estar, febre baixa, náuseas, vômitos, alterações sensoriais imprecisas no local da mordedura. Geralmente o paciente sente dor e irritação no local da ferida. Posteriormente a doença progride para a fase neurológica aguda, que pode se manifestar como raiva encefalítica (furiosa) ou

paralítica. A maior parte dos pacientes desenvolve a forma encefalítica. Nesta os sintomas característicos são: excitabilidade, alucinações, sensibilidade a luz e ao som, salivação excessiva, hidrofobia e aerofobia. O paciente pode apresentar dolorosos espasmos laríngeos e faríngeos, que podem levar a hidrofobia e aerofobia. Normalmente depois dessa fase o paciente vai a óbito em cinco dias. Pacientes que desenvolvem a fase paralítica apresentam paralisia flácida, primeiramente do membro exposto ao vírus. Podendo evoluir para tetraplegia, a morte acontece após o início da paralisia diafragmática e bulbar em algumas semanas (ACHA; SZYFRES, 2003; NIGG; WALKER, 2009).

Não existe tratamento comprovadamente eficaz contra a raiva. Em 2004, foi aplicado pela primeira vez o Protocolo de Milwaukee para tratamento da raiva humana. Em Wisconsin, uma jovem de 15 anos, diagnosticada com raiva havia sido mordida por um morcego em sua mão esquerda, cerca de um mês antes de apresentar sintomas e não havia recebido o esquema de profilaxia pós-exposição. Foram detectados anticorpos neutralizantes antirrábicos em seu soro e líquido cefalorraquidiano (LCR). Ela foi tratada com cetamina, antivirais (ribavirina e amantadina) e foi submetida ao coma terapêutico induzido, com midazolam e fenobarbital. A jovem sobreviveu com sequelas neurológicas leves (JACKSON, 2013).

Tal protocolo conta com medidas de suporte para diminuir as demandas metabólicas do SNC e administração de antivirais. Após esse caso, adaptações desse protocolo foram realizadas, com resultados positivos. Entretanto não há garantia de sobrevivência do paciente, nem de ausência de sequelas neurológicas (NIGG; WALKER, 2009).

Em 2008, no Hospital Universitário Oswaldo Cruz, em Recife – Pernambuco, foi aplicado em um jovem de 15 anos, que sofreu agressão por um morcego hematófago, um tratamento semelhante ao proposto no Protocolo de Milwaukee. O paciente conseguiu se recuperar, sendo o primeiro caso de cura de raiva humana no Brasil, o protocolo utilizado foi denominado Protocolo de Recife (BRASIL, 2009).

#### **1.4 Imunobiológicos para raiva**

Embora fatal, uma vez desenvolvidos os sintomas clínicos, a raiva pode ser prevenida. Atualmente são recomendadas a profilaxia pré-exposição e pós-

exposição dependendo do caso. A primeira é indicada para indivíduos com alto risco de exposição ao RABV, como profissionais (médicos veterinários, biólogos, dentre outros). Nesse caso é aplicado um esquema vacinal de três doses (dia zero, sete e 28), podendo ser administrado por via intramuscular (IM) ou intradérmica (ID). Pela via IM utiliza-se a dose completa do frasco ampola e a aplicação pode ser feita no músculo deltoide ou vasto lateral da coxa. No caso da via ID é administrado 0,1 mL da vacina reconstituída (BRASIL, 2014a).

Após o décimo quarto dia da aplicação da última dose deve ser feito o controle sorológico. Caso o título de anticorpos seja maior que 0,5 UI/mL é considerado que houve resposta satisfatória. Se estiver abaixo desse valor é necessária a administração de uma dose de reforço. É recomendado que o controle sorológico de profissionais expostos ao risco seja realizado de seis em seis meses (BRASIL, 2014a; NIGG; WALKER, 2009).

A profilaxia pós-exposição deve ser realizada caso tenha ocorrido uma possível exposição ao RABV. Imediatamente após a agressão, deve-se lavar a ferida em água corrente abundante com sabão, o que diminui o risco de infecção. Deve-se aplicar antissépticos (polivinilpirrolidona-iodo, povidine e digluconato de clorexidina ou álcool 70%) na ferida. Posteriormente, o indivíduo deve receber orientações de um profissional de saúde e de acordo com a avaliação receber um esquema vacinal adequado e imunização passiva nos casos mais graves, pela aplicação do soro antirrábico ou imunoglobulina antirrábica humana (BRASIL, 2014a).

Segundo a Nota Informativa nº 26-SEI/2017-CGPNI/DEVIT/SVS/MS, que “Informa sobre alterações no esquema de vacinação da raiva humana pós-exposição e dá outras orientações”, o esquema de profilaxia da raiva pós-exposição pela via IM foi reduzido de cinco para quatro doses da vacina (inativada), nos dias zero, três, sete, 14. Para via intramuscular utiliza-se a dose completa, no músculo deltoide ou vasto lateral da coxa. Essa Nota também informa que é possível optar pela via ID, fracionando o frasco ampola para 0,1 mL/dose e aplicando nos dias zero, três, sete e 28, sendo que serão administrados por vez duas doses em dois locais distintos. Vale ressaltar que no caso de aplicação por via ID, a vacina deve ser reconstituída e utilizada no prazo de 6-8 horas, conservada em temperatura de 2-8 °C, sendo descartada após esse período (BRASIL, 2017).

O acesso imediato à profilaxia pós-exposição adequada, é quase 100% eficaz na prevenção de mortes por raiva (BRASIL, 2014a).

O Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Ministério da Saúde é responsável pelo abastecimento dos imunobiológicos necessários para profilaxia da raiva humana no Brasil, são eles: vacina antirrábica de cultivo celular, soro antirrábico heterólogo e imunoglobulina antirrábica homóloga (BRASIL, 2014a).

Atualmente no Brasil, o PNI conta com vacina de raiva (inativada), uma vacina desenvolvida a partir de linhagem de células renais de macacos africanos (células Vero). A vacina purificada cultivada em células Vero é produzida pela empresa Sanofi Pasteur (Lyon, France), sua importação e fornecimento ao Ministério da Saúde são feitos pelo Instituto Butantan (INSTITUTO BUTANTAN, [S.d.]a). A vacina induz resposta imune ativa entre sete a 10 dias, levando a produção de anticorpos neutralizantes, que podem persistir por até dois anos (BRASIL, 2014b). A potência mínima recomendada para a vacina de raiva é de 2,5 UI/dose (BRASIL, 2014a).

O soro antirrábico heterólogo consiste de uma solução concentrada e purificada de anticorpos, preparada em equinos imunizados contra raiva. É recomendada uma dose de soro de 40 UI/kg do paciente, que deve ser aplicado na lesão ou ao seu redor (BRASIL, 2014b).

A imunoglobulina heteróloga contra o RABV tem como principal fornecedor o Instituto Butantan, além do Instituto Vital Brazil e Fundação Ezequiel Dias (BRASIL, 2018b).

A administração de imunoglobulinas antirrábicas é realizada a fim de prover anticorpos vírus neutralizantes no espaço de tempo entre administração da vacina e a produção de anticorpos. Confere imunidade passiva por um curto período de tempo, aproximadamente 21 dias (MOURA, 2009).

A imunoglobulina antirrábica humana é uma solução concentrada e purificada de anticorpos, preparada a partir de sangue de indivíduos imunizados contra raiva. É mais segura que o soro heterólogo, porém sua produção é limitada e, por isso, seu custo é altíssimo. Só é utilizada quando o paciente se enquadra em um dos seguintes itens: ocorrência de quadros anteriores de hipersensibilidade; uso prévio de imunoglobulinas de origem equídea; e existência de contatos frequentes com animais, principalmente com equídeos. A dose recomendada é de 20 UI/kg. (BRASIL, 2014a).

## 1.5 Controle da qualidade

As Boas Práticas de Fabricação determinam que os produtos médicos tenham um programa de garantia da qualidade. Este é um sistema que busca garantir a segurança e eficácia de produtos acabados. O controle da qualidade faz parte do sistema de garantia da qualidade e consiste de inspeções e testes para detectar defeitos no produto (MOURA, 2009).

Atualmente, os imunobiológicos devem ser produzidos de acordo com requerimentos e orientações publicados por agências reguladoras como: *Food and Drug Administration* (FDA), *European Directorate for the Quality of Medicines* (EDQM), Farmacopeia Europeia (Ph. Eur.), Farmacopeia Brasileira (Ph. Br.) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a fim de garantir níveis mínimos de qualidade (MOURA, 2009).

De acordo com a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n.º 73/2008 da ANVISA, que dispõe sobre o “Regulamento Técnico para procedimento de liberação de lotes de vacinas e soros hiperimunes heterólogos para consumo no Brasil e também para exportação”, é de responsabilidade do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz) a liberação de todos os lotes de vacinas e soros hiperimunes heterólogos utilizados no Brasil e para exportação. Sendo assim, todos os lotes de imunobiológicos de uso humano disponíveis para raiva no Brasil são analisados e liberados pelo INCQS/Fiocruz (BRASIL, 2008b).

Os imunobiológicos para raiva humana são encaminhados ao INCQS/Fiocruz e submetidos, inicialmente, a análise documental, que consiste na análise do protocolo resumido da produção, controle da qualidade de etapas da produção, lote final e matérias primas. Posteriormente, as amostras são submetidas a análise laboratorial para avaliar a consistência de produção (BRASIL, 2008b; BRASIL, 2010b).

As análises laboratoriais realizadas são baseadas nas monografias da Ph. Br. que está em sua 5ª edição. Nesta publicação estão descritas monografias para controle de vacinas contra Raiva (inativada), soros antirrábicos de origem equina e imunoglobulina antirrábica humana (BRASIL, 2010b).

## 1.6 Determinação da potência em soro antirrábico

Segundo a 5ª edição da Ph. Br; para determinação da potência em soro antirrábico podem ser utilizados dois métodos: neutralização de vírus rábico em: 1) camundongos; 2) células *Baby Hamster Kidney* (BHK-21) (BRASIL, 2010b). Os testes de neutralização viral são baseados no princípio de que o vírus ao interagir com anticorpos específicos é neutralizado, perdendo sua capacidade de infectar células (BRASIL, 2008a).

### 1.6.1 Vírusneutralização em camundongos

O método em camundongos foi o primeiro ensaio de neutralização viral desenvolvido para raiva (WEBSTER; DAWSON, 1935; SMITH, 1991) e já foi considerado o “padrão ouro” para validar outros testes (SMITH, 1991). Esse método tem como objetivo determinar a dose neutralizante necessária (dose efetiva 50%) para proteger os camundongos contra os efeitos letais de uma dose desafio de RABV (BRASIL, 2010b).

São utilizadas diluições seriadas de soro frente a uma diluição constante de RABV, que são incubadas para que haja a neutralização do vírus nas diluições em que anticorpos estejam presentes, havendo esgotamento destes com a diluição. Após a incubação, as misturas soro/vírus são inoculadas por via intracerebral nos animais, que são observados por 14 dias, para verificar morte e sobrevivência. Dessa forma é possível determinar a potência estimada do soro, que deve ser de no mínimo 200 UI/mL (BRASIL, 2010b).

### 1.6.2 Vírusneutralização em células BHK-21

Esse ensaio é baseado no Teste de Rápida Inibição de Focos Fluorescentes (RFFIT), sendo o método de eleição para verificação da potência de imunoglobulinas Antirrábicas (IgAR) visando o controle da qualidade e liberação de lotes. É um método mais rápido, mais preciso e reprodutível cuja relevância na detecção de anticorpos neutralizantes contra raiva já foi demonstrada. O Ensaio de Potência de Neutralização Viral (EPNV) *in vitro*, baseado no RFFIT, foi incluído na Ph. Br. em

2010 com base nos resultados obtidos em estudo colaborativo desenvolvido pelo INCQS e pelo Instituto Butantan para validação do ensaio (MOURA et al, 2008).

No EPNV, as amostras a serem testadas são diluídas em série, expostas ao RABV e incubadas para que ocorra a reação entre o vírus e anticorpos neutralizantes presentes na amostra, levando a neutralização viral. Posteriormente, uma suspensão de células recentemente tripsinizada é adicionada a mistura soro/vírus. Depois as células são incubadas com a mistura soro/vírus, o antígeno presente na monocamada reage com o conjugado para raiva com fluoresceína. Por fim, os poços são avaliados microscopicamente, quanto a presença ou ausência de vírus rábico (SMITH; YAGER; BAER, 1996).

O nível de anticorpos neutralizantes é determinado contando campos microscópicos com imunofluorescência positiva. Os resultados são expressos em campos positivos pelo total de campos lidos, os quais são utilizados para calcular o título da amostra. Os resultados do título podem ser padronizados e expressos em UI/mL por comparação com um soro de referência de título conhecido (YAGER; MOORE, 2015). A potência estimada para o soro deve ser de, no mínimo, 200 UI/mL (BRASIL, 2010b).

### **1.7 Padrão de referência biológico**

Um padrão de referência biológico é uma preparação de composição complexa, que requer ensaios biológicos ou imunológicos para sua caracterização apropriada. Como tais ensaios são geralmente comparativos e não absolutos, o padrão de referência é essencial na definição da natureza qualitativa e magnitude relativa da resposta biológica ou imunológica (OMS, 2006).

Um padrão de referência biológico deve ser um material autêntico e uniforme, destinado para o uso em ensaios especificados, onde suas propriedades são comparadas com o produto examinado. Esse padrão é produzido em um único lote e deve possuir um grau de pureza adequado para seu uso. (USP, 2017; OMS, 2011).

Existem os padrões de referência internacionais que são fornecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para serem utilizados como calibradores de ensaios, permitindo que os resultados do ensaio biológico sejam expressos da mesma maneira em todo o mundo. A OMS atribui a esse padrão a Unidade Internacional (UI) (OMS, 2006).

Também há os padrões de referência secundários, que são estabelecidos por autoridades regionais ou nacionais, ou por outros laboratórios, calibrados e rastreáveis aos materiais primários da OMS, destinados a testes de rotina (OMS, 2006).

Sendo internacional ou secundário, os padrões de referência precisam ser previamente estabelecidos, o que consiste em um longo estudo, ensaios interlaboratoriais, que devem seguir as recomendações da OMS, a fim de garantir que esse padrão tenha atividade semelhante ao padrão internacional. Depois de estabelecido, o padrão pode ser distribuído para ser utilizado nos ensaios a que se destinam (OMS, 2006).

### **1.8 Potência relativa**

Devido a variabilidade inerente dos ensaios biológicos, uma medida absoluta de potência é mais variável do que uma medida relativa. Por isso, para tais ensaios foi adotada a metodologia da potência relativa, onde a substância teste é comparada com um padrão de referência. Sendo assim, deve-se determinar quanto da substância a ser examinada (teste) produz o mesmo efeito biológico que determinada concentração da preparação padrão. É essencial que os testes com o padrão e a substância teste sejam realizados ao mesmo tempo e sob condições idênticas (SCHROCK, 2012; COUNCIL OF EUROPE, 2016).

A potência relativa é uma medida sem unidade, obtida de uma comparação das relações dose-resposta das preparações teste e padrão. Para a comparação relativa, geralmente a potência atribuída ao padrão é 1 (USP, 2017).

A utilização de padrões de referência em ensaios de potência relativa permite avaliar a sua precisão e expressar os resultados em UI (BRASIL, 2010b). Para a vacina e soro antirrábico, a potência é expressa como valor relativo (MOURA, 2009).

Nos ensaios de potência relativa é importante a observação do intervalo de confiança, pois este dá uma indicação da precisão com a qual a potência foi estimada. Geralmente em ensaios biológicos são escolhidos intervalos de confiança de 95%. Cálculos são realizados para estabelecer esses limites de forma a garantir que existe 95% de probabilidade que os intervalos definidos incluam a potência verdadeira (COUNCIL OF EUROPE, 2016).

## **2 JUSTIFICATIVA**

Apesar de ser possível prevenir por meio de vacinação e, dependendo da gravidade do caso, de soro antirrábico, a raiva causa anualmente cerca de 59.000 óbitos no mundo, sendo um problema de saúde pública. Dessa forma, é de suma importância garantir a qualidade das vacinas e dos soros, fundamentais na profilaxia. Portanto, são imprescindíveis a padronização e o estabelecimento de padrões biológicos, para que os ensaios de determinação da potência relativa dos imunobiológicos para raiva sejam realizados.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Padronizar um soro antirrábico candidato à referência nacional que, futuramente será estabelecido e, posteriormente, fornecido aos laboratórios produtores, para sua utilização.

#### 3.2 Objetivos específicos

- 1) Realizar matriz de ensaios de EPNV em placas de 96 orifícios com os soros candidatos, frente ao 2º Padrão de Referência Internacional de Imunoglobulina Antirrábica (IR) da OMS.
- 2) Utilizar o *software* CombiStats do *European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare* (EDQM) para obtenção da dose efetiva 50% (DE<sub>50</sub>) e da potência (UI).
- 3) Determinar o título do soro candidato, por frasco, a partir da média calculada com os resultados obtidos de cada ensaio.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Soros**

#### **4.1.1 Soro teste (ST)**

Foi utilizado o soro candidato a referência de lote BR015, produzido pelo Instituto Butantan (São Paulo - BR) e doado ao INCQS/Fiocruz, sendo candidato para estabelecimento como novo padrão nacional de referência. Sua forma de apresentação é em frascos contendo soro antirrábico equino liofilizado que devem ser mantidos a -20 °C. Para os ensaios realizados o mesmo foi reconstituído em 1 mL de água destilada estéril.

#### **4.1.2 Soro Antirrábico de Referência Nacional**

Foi utilizado o soro antirrábico de referência nacional lote BR011, produzido pelo Instituto Butantan (São Paulo - BR) e estabelecido em 2007. Sua forma de apresentação é em frascos contendo soro antirrábico equino liofilizado, que deve ser mantido a -20 °C. A potência estabelecida para o lote é de 560 UI/frasco. Nos ensaios este soro foi reconstituído em 1 mL de água destilada estéril.

### **4.2 Ensaio sorológico para determinação de potência**

No ensaio sorológico para determinação da potência, os soros foram avaliados pelo EPNV, baseado no RFFIT, como descrito por MOURA e colaboradores (2008). Os ensaios seguem a metodologia proposta no Procedimento Operacional Padrão (POP) 65.3430.029: Ensaio de potência *in vitro* para soro antirrábico.

#### **4.2.1 Cultura de células**

Foram utilizadas células BHK-21 clone 13 [C – 13] de linhagem certificada (CCL – *certified cell line* – 10) de rim de hamster neonato (*baby hamster kidney*), obtidas da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC – Manassas, EUA). As

células foram mantidas, em sistema de lote semente, pelo Setor de Cultura de Células do Laboratório de Vacinas Virais (LVV) – Células / DI-Fiocruz, estocadas em criotubos de 2,0 mL, conservadas por criopreservação em nitrogênio líquido (-196 °C). No momento da utilização, as células foram descongeladas a 37 °C e cultivadas em garrafas de poliestireno de 25 cm<sup>2</sup> ou 75 cm<sup>2</sup>, em meio essencial mínimo de Dulbecco, suplementado com 50 UI/mL de penicilina e 0,05 mg/mL de estreptomicina, 0,42 mg/L de anfotericina B, 0,3 mg/mL de glutamina e 10% de soro fetal bovino. Após descongelamento, as células foram utilizadas por até 30 passagens.

#### 4.2.2 Cepa viral

A cepa CVS-11 de RABV utilizada no EPNV foi obtida do LVV-Raiva/DI, lote VT05 (CVS-11; origem ATCC VR 959) doada pelo Instituto Butantan (São Paulo - BR). Mantida criopreservada a -70 °C ± 1 °C, contendo suspensão viral com dose infecciosa de 10<sup>4</sup>/0,05 mL, estabelecido em julho de 2017.

#### 4.2.3 Imunoglobulina de Referência Internacional (IR)

Foi utilizado o 2º Padrão de Referência Internacional (IR) de Imunoglobulina Antirrábica humana da OMS, obtido do *National Institute of Biological Standards and Control* (NIBSC - UK).

A preparação liofilizada de imunoglobulina contém 30 UI de anticorpos contra o RABV por ampola. Uma ampola foi reconstituída a 2 UI/mL e a partir desta diluição, o conteúdo foi diluído a 1/4 para ser distribuído em alíquotas de 270 µL, mantidas a -70 °C ± 1 °C.

#### 4.2.4 Ensaio de Potência de Neutralização Viral

Foram utilizadas microplacas de fundo plano de 96 poços para cultivo celular (Falcon, 353072). A IR, pré-diluída a 1,0 UI/mL, foi serialmente diluída em triplicatas, fator 2 e testada nas diluições finais, após a adição do vírus, de 1/16 até 1/128. Os soros teste (ST) foram pré-diluídos a 1:400 (BR011) e 1:600 (BR015), distribuídos e diluídos em fator 2, sendo titulados também nas diluições finais de 1/16 a 1/128 em

triplicata, nas placas. A suspensão de vírus trabalho (VT) diluída para conter 200 doses formadoras de focos fluorescentes 50% (DFF<sub>50</sub>) iniciais foi distribuída nos poços de IR, ST e controle de vírus. Este último previamente diluído em criotubos nas diluições de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-5</sup> e distribuído na placa. Foram utilizados dois poços para controle de células (CC). A distribuição na placa pode ser visualizada na Figura 3.

Figura 3 - Esquema de placa para Ensaio de Potência de Neutralização Viral.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	IR 1:16	IR 1:16	IR 1:16	BR011 1:16	BR011 1:16	BR011 1:16	BR015 1:16	BR015 1:16	BR015 1:16	VT 10 <sup>-2</sup>	VT 10 <sup>-2</sup>	VT 10 <sup>-2</sup>
<b>B</b>	IR 1:32	IR 1:32	IR 1:32	BR011 1:32	BR011 1:32	BR011 1:32	BR015 1:32	BR015 1:32	BR015 1:32	VT 10 <sup>-3</sup>	VT 10 <sup>-3</sup>	VT 10 <sup>-3</sup>
<b>C</b>	IR 1:64	IR 1:64	IR 1:64	BR011 1:64	BR011 1:64	BR011 1:64	BR015 1:64	BR015 1:64	BR015 1:64	VT 10 <sup>-4</sup>	VT 10 <sup>-4</sup>	VT 10 <sup>-4</sup>
<b>D</b>	IR 1:128	IR 1:128	IR 1:128	BR011 1:128	BR011 1:128	BR011 1:128	BR015 1:128	BR015 1:128	BR015 1:128	VT 10 <sup>-5</sup>	VT 10 <sup>-5</sup>	VT 10 <sup>-5</sup>
<b>E</b>												
<b>F</b>										CC	CC	
<b>G</b>												
<b>H</b>												

IR – Imunoglobulina de Referência Internacional; VT – Vírus Trabalho; CC – Controle de células  
Fonte: (Do autor, 2019).

As placas foram incubadas a 36,5 °C ± 0,5 °C em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 90 minutos. Depois, foram adicionados 100 µL da suspensão de células BHK-21, ajustada para a concentração de 3,5x10<sup>5</sup> células/mL. As placas foram incubadas novamente nas mesmas condições por 22 horas.

#### 4.2.5 Teste de imunofluorescência direta

Depois da incubação foi realizado o teste de imunofluorescência direta em microscópio invertido de imunofluorescência Nikon eclipse TS100, com objetiva 20x fluorita LWD 20x/0,40 Ph1 ADL ∞/1,2 WD 3,1 e, quando necessário, objetiva de 40x LWD 40x/0,55 ∞/1,2 WD2,1. Foi utilizado um conjugado comercial (*Liquid Rabies Antinucleocapsid Conjugate* – Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, França). A monocamada de células foi previamente fixada em acetona gelada diluída a 80%

com água destilada (v/v), por 15 minutos e as placas foram secas ao ar. Em cada poço da placa foram adicionados 40 µL de conjugado na diluição trabalho (1/20) e as placas foram incubadas a  $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  por  $30 \pm 1$  minuto. Posteriormente foram lavadas com salina tamponada com fosfatos, do inglês *Phosphate Buffered Saline* (PBS) pH 8,1 e foi realizada a leitura no microscópio, no aumento de 200x.

Na leitura foram contados oito campos por poço, expressando os resultados em número de campos positivos pelo total de campos lidos.

### **4.3 Análise estatística**

O título de anticorpos neutralizantes dos soros teste foi calculado no final da prova pelo método de probitos, utilizando o *software* de análise estatística para ensaios biológicos CombiStats, para obtenção da  $DE_{50}$  e da potência (UI/frasco). Os resultados da potência obtidos foram avaliados quanto a sua homogeneidade e foram combinados para obtenção da média que foi considerada o título do lote e expressa em UI/frasco.

### **4.4 Média da potência dos soros teste**

O título padronizado dos soros teste foi expresso como a média dos resultados obtidos. Isto foi realizado utilizando-se o CombiStats que avalia a homogeneidade dos dados e apresenta três opções de média. A média geométrica ponderada deve ser utilizada caso os resultados sejam considerados homogêneos no teste de qui quadrado ( $p > 0,1$ ). Se os resultados forem heterogêneos ( $p < 0,1$ ), deve ser usada a média semi ponderada. A terceira opção é a média não ponderada que só deve ser usada quando os dados forem considerados heterogêneos e houver mais de seis resultados.

### **4.5 Critérios para aceitação do ensaio**

Para que o ensaio seja considerado válido são analisados os seguintes critérios:

- a) A análise estatística deve mostrar que há uma inclinação significativa na curva dose-resposta (coeficiente de correlação -  $p < 0,05$ ).

- b) A análise estatística deve mostrar que não há desvios significativos de linearidade e paralelismo ( $p > 0,05$ ). Quando ocorrerem desvios de paralelismo deve ser usado o teste de equivalência de inclinações.
- c) O teste de equivalência, mostra se a inclinação obtida pelas amostras é equivalente a obtida pelo padrão. Deve ser avaliado comparando-se os intervalos de confiança obtidos para a diferença e a razão entre as inclinações do padrão e das amostras. Para que as inclinações sejam consideradas equivalentes, o intervalo de confiança obtido para a diferença deve compreender o valor zero e o intervalo de confiança para a razão deve compreender o valor um. Se o ensaio atende esses requisitos, as inclinações são consideradas equivalentes e, por consequência, o paralelismo é considerado satisfatório.
- d) O controle de células (controle não infectado) apresente uma camada de células semiconfluente em cada poço.
- e) O título do VT esteja entre 30 e 300 DFF<sub>50</sub>, deve haver fluorescência na coluna do VT até  $10^{-2}$ .
- f) A dose inibidora de focos fluorescentes (DIFF<sub>50</sub>) da imunoglobulina de referência e teste estejam situadas entre a menor e maior dose utilizadas no ensaio.
- g) A DIFF<sub>50</sub> obtida para a imunoglobulina de referência permaneça dentro dos limites de confiança de 99%.

## 5 RESULTADOS

Foram realizados quatro EPNV em células BHK-21 para o soro candidato à referência lote BR015 e soro de referência nacional lote BR011, em dias diferentes. A Tabela 3 mostra os títulos obtidos para ambos, em UI/frasco, com suas respectivas médias, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV). Além disso, também mostra os resultados obtidos para regressão, linearidade, paralelismo e teste de equivalência de inclinações dos ensaios.

Tabela 3 - Títulos em UI/frasco obtidos por ensaios EPNV para os soros de lote BR011 e BR015.

	Título em UI/frasco					
	BR011	BR015	Reg <sup>1</sup>	Lin <sup>2</sup>	Par <sup>3</sup>	Equ <sup>4</sup>
<b>Ensaio 1</b>	879,09	358,26	0,000	0,632	0,064	-
<b>Ensaio 2</b>	1329,24	1013,58	0,000	0,042*	0,000*	-
<b>Ensaio 3</b>	562,36	571,44	0,000	0,222	0,473	OK
<b>Ensaio 4</b>	922,57	788,31	0,000	0,006*	0,350	OK
<b>Média</b>	923,32	682,90	-	-	-	-
<b>DP<sup>5</sup></b>	314,65	281,82	-	-	-	-
<b>CV<sup>6</sup></b>	34,08	41,27	-	-	-	-

<sup>1</sup>Regressão; <sup>2</sup>Linearidade; <sup>3</sup>Paralelismo; <sup>4</sup>Teste de equivalência de inclinações; <sup>5</sup>Desvio padrão;

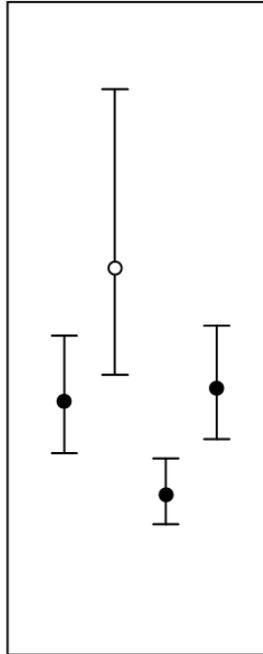
<sup>6</sup>Coeficiente de variação. \*Resultados que apresentaram desvios.

Fonte: (Do autor, 2019).

A Tabela 3 demonstra que os Ensaios 1 e 3 apresentaram regressão significativa na curva dose-resposta e não mostraram desvios significativos de linearidade e paralelismo, atendendo aos critérios preestabelecidos. Os Ensaios 2 e 4 apresentaram desvios de linearidade. Além disso, o Ensaio 2 indicou desvio de paralelismo e não foi aprovado no teste de equivalência. Entretanto, seus dados foram utilizados no trabalho, devido ao pequeno número de ensaios realizados.

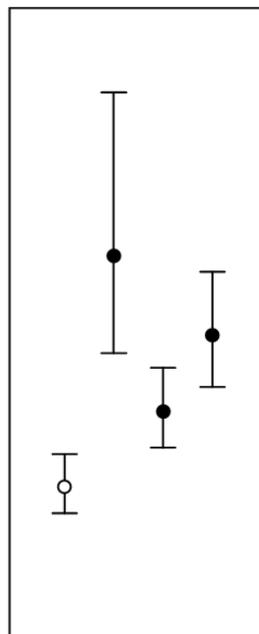
A Figura 4 e 5, que foi obtida a partir dos cálculos realizados no CombiStats, mostra os intervalos de confiança de cada ensaio para os soros de lote BR011 e BR015, respectivamente.

Figura 4 - Intervalos de confiança das médias das potências de cada ensaio para o lote BR011. Da esquerda para a direita: Ensaio 1, 2, 3 e 4.



● Intervalos com valores aceitáveis. ○ Intervalo de confiança com valores discrepantes.  
 Fonte: (Do autor, 2019).

Figura 5 - Intervalos de confiança das médias das potências de cada ensaio para o lote BR015. Da esquerda para a direita: Ensaio 1, 2, 3 e 4.



● Intervalos com valores aceitáveis. ○ Intervalo de confiança com valores discrepantes.  
 Fonte: (Do autor, 2019).

Levando em consideração as Figuras 4 e 5, foi elaborada a Tabela 4, eliminando as médias dos ensaios que apresentaram intervalo de confiança com

valores discrepantes. Para o soro de lote BR011 foi eliminado o Ensaio 2 e para o lote BR015 foi eliminado o Ensaio 1. A Tabela 4 mostra os títulos considerados para cada soro e as novas médias, DP e CV.

Tabela 4 – Novos títulos em UI/frasco obtidos por ensaios EPNV para os soros de lote BR011 e BR015.

	Título em UI/frasco	
	BR011	BR015
<b>Ensaio 1</b>	879,09	<del>358,26*</del>
<b>Ensaio 2</b>	<del>1329,24*</del>	1013,58
<b>Ensaio 3</b>	562,36	571,44
<b>Ensaio 4</b>	922,57	788,31
<b>Média</b>	788,01	791,11
<b>DP</b>	196,62	221,08
<b>CV*</b>	24,95	27,95

\*Ensaio excluído por apresentarem intervalos de confiança com valores discrepantes.  
Fonte: (Do autor, 2019).

Baseado nos resultados da Tabela 4, as médias obtidas para cada soro foram combinadas no *software* Combistats, que avaliou a homogeneidade das mesmas. A Tabela 5 mostra qual média foi escolhida, de acordo com o valor de p, e o título final em UI/frasco.

Tabela 5 - Título final para os soros BR011 e BR015 em UI/frasco.

Soros	p*	Média	Título (UI/frasco)
<b>BR011</b>	0,001	Semi ponderada	766
<b>BR015</b>	0,008	Semi ponderada	741

p\* p valor de homogeneidade  
Fonte: (Do autor, 2019).

A Tabela 6 mostra os resultados obtidos da DE<sub>50</sub> da IR, soro de referência nacional lote BR011 e soro candidato à referência lote BR015.

Tabela 6 - Dose efetiva 50% (DE<sub>50</sub>) da Imunoglobulina de Referência Internacional, soros lote BR011 e BR015.

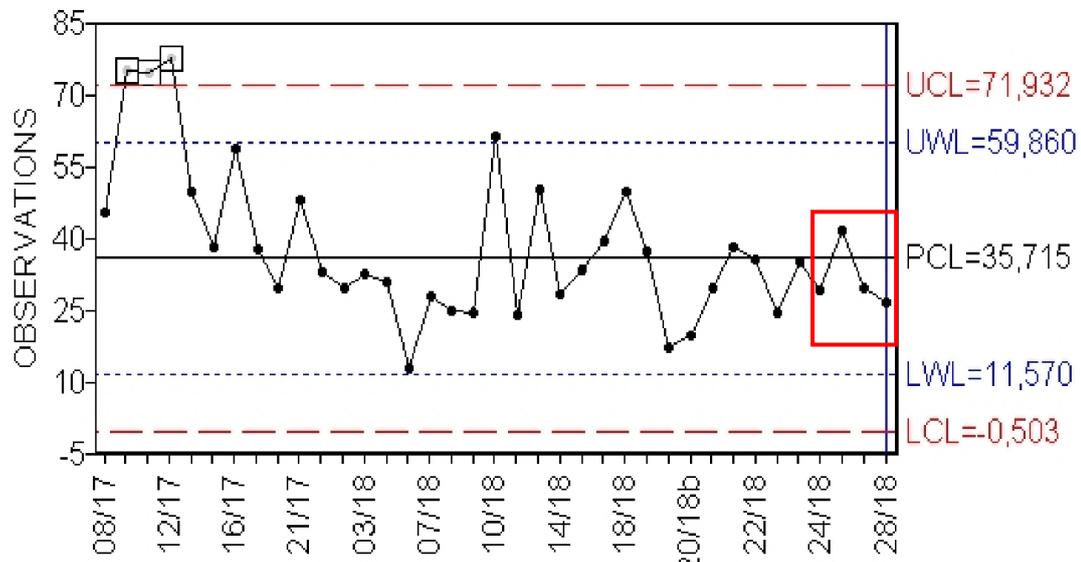
	DE <sub>50</sub> <sup>1</sup>		
	IR <sup>2</sup>	BR011	BR015
<b>Ensaio 1</b>	29,23	64,16	47,84*
<b>Ensaio 2</b>	41,43	437,68*	139,98
<b>Ensaio 3</b>	29,45	41,40	56,09
<b>Ensaio 4</b>	69,16	60,70	69,16

<sup>1</sup> Dose efetiva 50%; <sup>2</sup> Referência Internacional, \* Ensaios excluídos devido apresentarem intervalos de confiança com valores discrepantes.

Fonte: (Do autor, 2019).

A Figura 6 mostra o gráfico de controle referente a DE<sub>50</sub> da Referência Internacional utilizado na rotina do laboratório, são apresentados os valores para os últimos ensaios realizados.

Figura 6 - Gráfico de Controle da Imunoglobulina de Referência Internacional utilizado na rotina do laboratório.



UCL – Limite de controle superior; UWL – Limite de alerta superior; PCL – Linha central do processo; LWL – Limite de alerta inferior; LCL – Limite de controle inferior.

Fonte: (Do autor, 2019).

Os dados apresentados no gráfico de controle (Figura 6) indicam que os dados se ajustaram à distribuição normal (Kolmogorov-smirnov - K-s: 0,425).

Com auxílio do CombiStats foram calculados os títulos do VT, em DFF<sub>50</sub> para cada ensaio realizado. Os valores obtidos estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7 - Título do Vírus Trabalho, expresso em DFF<sub>50</sub>.

	<b>DFF<sub>50</sub><sup>1</sup></b>
	<b>VT<sup>2</sup></b>
<b>Ensaio 1</b>	114,81
<b>Ensaio 2</b>	31,60
<b>Ensaio 3</b>	85,76
<b>Ensaio 4</b>	110,00

<sup>1</sup> Dose formadora de focos fluorescentes; <sup>2</sup> Vírus trabalho  
Fonte: (Do autor, 2019).

Todos os valores obtidos para DFF<sub>50</sub>, conforme Tabela 7, atenderam ao critério estabelecido para o vírus trabalho que deve estar entre 30 e 300 DFF<sub>50</sub>.

Vale mencionar que em todos os ensaios o controle de células não foi infectado e apresentou uma camada de células confluyente em cada poço.

## 6 DISCUSSÃO

Este trabalho descreve o processo de padronização de um lote de soro antirrábico candidato à referência nacional utilizando ensaios de vírusneutralização em células BHK-21, a fim de obter a potência relativa do mesmo em UI/frasco, para futuramente realizar o seu estabelecimento. A vírusneutralização em células foi escolhida porque é um método alternativo, menos dispendioso e de realização menos tediosa que o teste *in vivo* (MOURA et al, 2008).

Por definição, o soro antirrábico heterólogo é uma solução purificada, específica e concentrada de imunoglobulinas (fração F(ab')<sub>2</sub>), preparada em equinos imunizados, capaz de conferir imunidade passiva por um período curto (por volta de 21 dias) (BRASIL, 2014b; INSTITUTO BUTANTAN, [S.d.]b).

Segundo a OMS é de suma importância que padrões biológicos sejam estabelecidos para que sua atividade biológica esteja padronizada e descrita no mesmo sistema de unidades por diferentes laboratórios (KIRKWOOD; SEAGROATT; SMITH, 1986).

De acordo com os critérios previamente estabelecidos, os Ensaios 1, 3 e 4 foram aprovados. O Ensaio 2 apresentou desvio significativo de paralelismo, porém devido ao pouco número de ensaios, seus dados foram utilizados neste trabalho.

O título obtido para o soro de referência nacional lote BR011 foi de 766 UI/frasco, sendo que a potência estabelecida para o lote foi de 560 UI/frasco. O valor encontrado para o título está elevado, em relação ao estabelecimento, realizado pelo INCQS. Entretanto, segundo a OMS, ensaios *in vivo* e *in vitro* podem apresentar variabilidade maior que 50%. Sendo assim, esse resultado demonstra uma variabilidade aceitável (OMS, 1997). O valor obtido se encontra dentro do preconizado pela legislação que é de 200 UI/mL (BRASIL, 2010b), visto que o A soro de lote BR011 foi reconstituído em 1 mL de água destilada estéril.

Para o soro candidato à referência nacional lote BR015 o título obtido foi de 741 UI/frasco, bem próximo ao BR011. Sendo assim, o soro candidato também atende ao título mínimo preconizado pela legislação (200 UI/mL) (BRASIL, 2010b).

Vale ressaltar que os dados obtidos são de ensaios de padronização exploratórios, outros ensaios deverão ser realizados para dar continuidade ao trabalho.

## 7 CONCLUSÃO

A análise dos resultados no presente estudo permitiu concluir que:

- De acordo com os resultados obtidos para o soro de referência nacional lote BR011 o valor de potência (766 UI/frasco) está em conformidade com o preconizado pela Ph. Br.
- O resultado de potência obtido para o soro candidato à referência nacional lote BR015 (741 UI/frasco) também atendeu ao estabelecido pela Ph. Br.
- Os dados apresentados neste trabalho estão relacionados a um estudo que busca padronizar um soro de referência nacional, para ensaios de soroneutralização. Os resultados de potência obtidos para o soro de lote BR015 mostram que esse se apresenta como um bom candidato à referência nacional.
- Posteriormente, deve ser dada continuidade ao trabalho, realizando novos ensaios, em um estudo interlaboratorial, a fim de estabelecer esse soro como referência nacional.

## REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Rabia. *In*: ACHA, P. N.; SZYFRES, B. (ed.). **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. p. 351-383. (Oficina Sanitaria Panamericana. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud).

BATISTA, H. B. C. R.; FRANCO A. C.; ROEHE, P. M. Raiva: uma breve revisão. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 125-144, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva**. Brasília – DF, 2008a. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 73, de 21 de outubro de 2008. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para procedimento de liberação de lotes de vacinas e soros hiperimunes heterólogos para consumo no Brasil e também para exportação. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 out. 2008b. Disponível em: [www.anvisa.gov.br/legis](http://www.anvisa.gov.br/legis). Acessado em: 14 dez. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Protocolo para Tratamento de Raiva Humana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 18, n. 4, p. 385-394, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Doenças Infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8 ed. revista. Brasília – DF, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Normas técnicas de profilaxia da raiva humana**. Brasília – DF, 2014a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais**. 4. ed. Brasília – DF, 2014b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância, prevenção e controle de zoonoses**. Brasília – DF, 2016. (Normas técnicas e operacionais).

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota Informativa nº 26-SEI/2017-CGPNI/DEVIT/SVS/MS “Informa sobre alterações no esquema de vacinação da raiva humana pós exposição e dá outras orientações”. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 jul. de 2017. Disponível em: [http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/agosto/04/Nota-Informativa-N-26\\_SEI\\_2017\\_CGPNI\\_DEVIT\\_SVS\\_MS.pdf](http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/agosto/04/Nota-Informativa-N-26_SEI_2017_CGPNI_DEVIT_SVS_MS.pdf). Acesso em 19. Dez. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica**. 2018a Disponível em:

<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/raiva/situacao-epidemiologica>. Acesso em: 07 fev. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação de abastecimento da imunoglobulina antirrábica e soro antirrábico e orientações quanto aos procedimentos a serem adotados no período de escassez desses imunobiológicos**. 2018b. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/o-ministro/961-saude-de-a-a-z/raiva/19783-situacao-de-abastecimento-da-imunoglobulina-antirrabica-e-soro-antirrabico-e-orientacoes-quanto-aos-procedimentos-a-serem-adotados-no-periodo-de-escassez-desses-imunobiologicos>. Acesso em: 19 ago. 2018.

COUNCIL OF EUROPE. 5.3 Statistical Analysis of Results of Biological Assays and Tests. *In*: THE EUROPEAN Pharmacopoeia. 9th ed. 2016. v. 9.2. p. 43-53.

DAVIS, B. M.; RALL, G.; SCHNELL, M. J. Everything You Always Wanted to Know About Rabies Virus (But Were Afraid to Ask). **Annual Review Virology**, v. 2, p. 451-471, 2015.

DEVELOPMENT and design of biological assays <1032>. *In*: THE UNITED States Pharmacopoeia 35. National Formulary 30. Rockville: U.S. Pharmacopoeia, 2017. p. 162. Disponível em: [http://www.usp.org/sites/default/files/usp\\_pdf/EN/2010-03\\_25\\_1032\\_PF36\(4\)\\_w\\_line\\_numbers.pdf](http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/2010-03_25_1032_PF36(4)_w_line_numbers.pdf). Acesso em: 20 dez. 2018.

HATZ, C. F. R.; KUENZIL, E.; FUNK, M. Relevance, Prevention, and Management in Travel Medicine. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 739-753, 2012.

INSTITUTO BUTANTAN. **Vacina Raiva (inativada)**. São Paulo: Instituto Butantan, [S.d.]a. Bula de remédio.

INSTITUTO BUTANTAN. Soro antirrábico (imunoglobulina heteróloga contra vírus rábico). São Paulo: Instituto Butantan, [S.d.]b. Bula de remédio.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3400.002**: gráficos de controle para medidas individuais e amplitudes móveis em ensaios biológicos. Rev. 3. Rio de Janeiro, 2017. 18 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

\_\_\_\_\_. **POP 65.3430.029**: ensaio de potência “in vitro” para soro antirrábico. Rev. 2. Rio de Janeiro, 2017. 32 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). **Genus**: Lyssavirus. 2018. Disponível em: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/negative-sense-rna-viruses/mononegavirales/w/rhabdoviridae/795/genus-lyssavirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/mononegavirales/w/rhabdoviridae/795/genus-lyssavirus). Acesso em: 15 dez. 2018.

JACKSON, A. C. Current and future approaches to the therapy of human rabies. **Antiviral Research**, v. 99, p. 61-67, 2013.

KIRKWOOD, T. B. L.; SEAGROATT V. A.; SMITH S. J. Statistical aspects of the planning and analysis of collaborative studies on biological standards. **Journal of Biological Standardization**, v. 14, p. 273-287, 1986.

MOURA, W. C. **Aplicação do conceito dos Três Rs nos ensaios de controle da qualidade de imunobiológicos para raiva**. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2009.

MOURA, W. C. et al. Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study. **Journal of Virological Methods**, v. 154, p. 7-13, 2008.

NIGG, A. J.; WALKER P. L. Overview, Prevention, and Treatment of Rabies. **Pharmacotherapy**, v. 29, n. 10, p. 1183-1195, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Validation of analytical assays. *In: WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements: part 2: Validation*. Geneva: p. 69- 73, 1997. Chp. 15.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards (revised 2004)**. Geneva: WHO Press, 2006. (Technical Report Series, n. 932).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccines: immunization, vaccines and biologicals**. Geneve, 2011. (WHO/IVB/11.03).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Rabies Vaccines: position paper**. Weekly epidemiological record, n.16. Geneva, p. 201-220, 2018a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **ZERO BY 30 The Global Strategic Plan to end human deaths from dog-mediated rabies by 2030**. Geneva, 2018b.

ROCHA, S. M. **Raiva silvestre: o perfil epidemiológico no Brasil (2002 a 2012)**. Brasília: Universidade de Brasília, 2014.

SCHROCK, R. D. Cell-Based Potency Assays: Expectations and Realities. **BioProcess Journal**, v. 11, n. 3, p. 4-12, 2012.

SINGH R. et. al. Rabies – epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, v. 37, n. 1, p. 212-251, 2017.

SMITH, J.S. Rabies serology. *In: Baer, G.M. (Ed.). The Natural History of Rabies*. 2. ed. Florida: CRC, 199. p. 235-252.

SMITH, J. S.; YAGER P. A.; BAER, G. M. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. *In: Meslin, F.-X., Kaplan M.M.; Koprowski, H. (ed). Laboratory Techniques in Rabies*. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 181-191.

SORO antirrábico. *In*: FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010b. v. 2. p. 1297-8.

WADA, M. Y.; ROCHA, S. M.; MAIA-ELKHOURY, A. N. S. Situação da raiva no Brasil, 2000 a 2009. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 4, p. 509-518, 2011.

WEANT, K. A.; BAKER, S. N. Review of Human Rabies Prophylaxis and Treatment. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 25, p. 225-242, 2013.

WEBSTER, L. T.; DAWSON, J. R. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 32, p. 570-573, 1935.

YAGER, M. L.; MOORE S. M. The Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test. *In*: Rupprecht C; Nagarajan, E.T. (ed.). **Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention**. Academic Press, p. 199-214, 2015.

YOUSAF, M. Z. *et al.* Rabies molecular virology, diagnosis, prevention and treatment. **Virology Journal**, v. 9, n. 50, p. 1-5, 2012.