

DESENVOLVIMENTO DE ELISA PARA CONTROLE DA QUALIDADE DE SORO ANTIRRÁBICO

Matheus da Costa Apolinário; Wildeberg Cal Moreira; Rafael Medeiros da Silva de Abreu;
Janaína Soares Cruz; Wlamir Corrêa de Moura

Laboratório de Vacinas Virais, Biofármacos e Cultura de Células - Raiva/Departamento de Imunologia/INCQS/ Fiocruz

INTRODUÇÃO

Os produtos disponíveis no mercado para a profilaxia da Raiva, como as vacinas e imunoglobulinas, precisam ser analisados por ensaios de controle da qualidade para averiguar a conformidade com o padrão determinado pela Farmacopeia Brasileira. Esta zoonose viral está incluída entre as doenças tropicais negligenciadas com alto índice de letalidade (99,9%). No que diz respeito ao soro antirrábico heterólogo equino, realiza-se o ensaio de potência baseado na capacidade de neutralização viral. Embora o ensaio em cultivo celular (*Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test* - RFFIT) seja indicado, testes *in vivo* ainda são empregados. Esses testes podem ser laboriosos, demorados, variáveis e requerem a manipulação de vírus viável. Com a implementação dos 3Rs (*Replacement, Reduction, and Refinement*), na utilização de animais de laboratório para fins científicos, a substituição por métodos *in vitro* tem sido cada vez mais estimulada. Dentre as técnicas com esse potencial, o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) se destaca como alternativa para demonstrar a consistência de produção dos lotes fabricados. O objetivo deste trabalho é desenvolver um ensaio ELISA indireto de titulação de soro antirrábico equino, para demonstrar a consistência de produção, visando a liberação deste produto, pelo laboratório nacional de controle da qualidade de imunobiológicos para a Raiva, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fiocruz. Fundamentado em estudos de validação realizados internacionalmente, o ensaio consistirá na utilização da vacina de referência nacional como antígeno (BR014), de fragmentos F(ab')₂ altamente purificados de soro antirrábico equino e anticorpos antissoro equino conjugados para a detecção.

OBJETIVOS

GERAL

Baseando-se em estudos de validação realizados internacionalmente, o presente trabalho visa desenvolver e aplicar um ELISA Indireto (ELISA-i) para titulação de soro equino, na liberação de lotes deste imunobiológico pelo laboratório de controle, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fiocruz.

JUSTIFICATIVAS

- Raiva endêmica no território nacional e custos envolvidos no atendimento médico;
- Controle da qualidade de Imunoglobulinas - determinação da potência;
- Ensaio de neutralização para quantificação de anticorpos - métodos *in vivo* e *in vitro* recomendados pela Farmacopeia Brasileira;
- Apenas um dos três produtores nacionais está apto a usar a técnica *in vitro*;
- Ensaios *in vivo* com precisão limitada;
- Nova abordagem da Consistência de Produção para liberação de lotes de produtos biológicos.

MATERIAIS

Padronização do ELISA-i de acordo com o método descrito no POP ELISA Gp do Laboratório de Vacinas Virais - Raiva

Antígeno para a captura das IARs

- Vacina contra raiva de referência (BR014) – Glicoproteínas do Virus Rábico concentrada;

Padronização do ELISA-i in house

- Utilização da vacina (BR014) como antígeno de revestimento das placas de 96 poços;
- Diluição e incubação dos SARs;
- Utilização de anticorpo de cabra anti-cavalo biotilado para detecção de anticorpos ligados aos antígenos de revestimento.

Padrões e amostras

- Utilização do 2º Padrão Internacional da OMS (WHO-IS) (NIBSC) de imunoglobulina antirrábica de referência de origem humana, calibrado em Unidades Internacionais (UI), 30 UI/mL;
- Análise de amostras de soro antirrábico do período entre 2022 e 2023, dos lotes recebidos no INCQS para controle da qualidade;
- Realização de ensaios preliminares para padronização do ELISA-i - determinação da faixa das diluições seriais.

PERSPECTIVAS

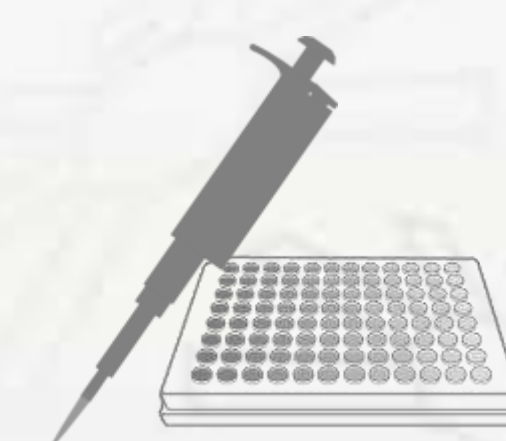
- Estabelecer o protocolo padronizado de execução da técnica após sua padronização;
- Pré-validar o ensaio ELISA-i para potência de soro antirrábico avaliando sua Relevância e Confiabilidade e propor ao BraCVAM o ELISA-i como método candidato a uma validação formal;
- Incluir o método na Farmacopeia Brasileira.

AGRADECIMENTOS

ESPECÍFICOS

- Padronizar a técnica de ELISA-i para determinação da potência do soro antirrábico;
- Avaliar a relevância do ELISA-i por meio de sua concordância com os resultados do método de neutralização viral, averiguando a sua capacidade de identificação de lotes subpotentes;
- Realizar a pré-validação intralaboratorial da técnica, visando demonstrar sua confiabilidade por meio da precisão intra e entre ensaios.

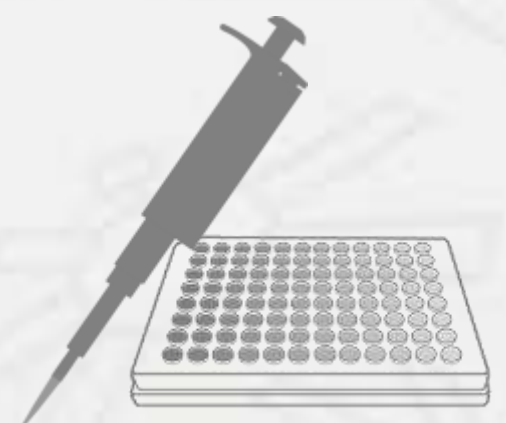
ELISA INDIRETO



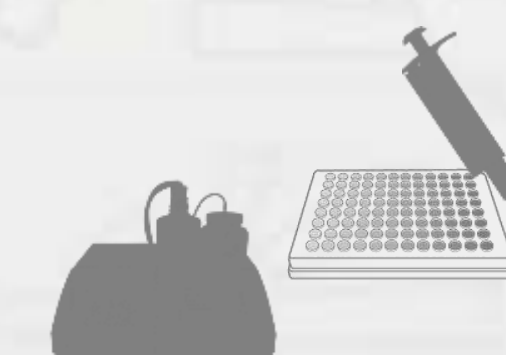
1. Revestimento de placas de 96 poços com 100 µl de antígeno antirrábico (BR014) - diluição em solução salina tamponada (pH 7,4) e manutenção da placa a 4 °C;



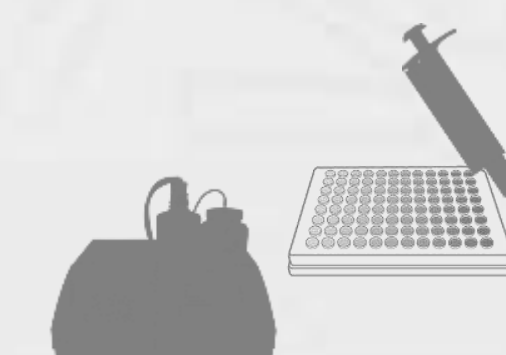
2. Série de 4 lavagens com solução salina tamponada (100 µl/poço) com PBST e tratamento com solução de bloqueio (1 hora a 37 °C);



3. Adição de 100 µl de amostra (1:500) em poços duplicados, incubação em temperatura ambiente (30 min);



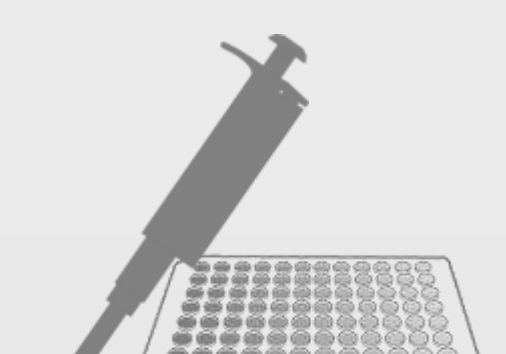
4. Série de 4 lavagens das placas com PBST e incubação com 100 µl/poço (1:20.000) de conjugado anti-IgG biotilado de cavalo (30 min a 37 °C);



5. Série de 4 lavagens das placas com PBST e posterior adição de 100 µl de substrato (OPD Sigma® 10 mg; 0,003% H₂O₂) em tampão citrato (0,5 M, pH 5,0) a cada poço;



6. Incubação das placas por 15 min a 37 °C;



7. Encerramento da reação com adição de 100 µl/poço de ácido sulfúrico 1N;

Medição da absorbância em leitor de placas ELISA (Molecular Devices) a 450 nm

REFERÊNCIAS

- KORIMBOCUS, J; DEHAY, N; TORDO, N; CANO, F; MORGEAUX, S. Development and validation of a quantitative competitive ELISA for potency testing of equine anti rabies sera with other potential use. *Vaccine*, v. 34, n. 28, p. 3310-3316, 2016.
- BRASIL, Farmacopeia Brasileira. 6. ed. Brasília: ANVISA, Vol 2, Produtos Biológicos. Soro antirrábico – PB 031-00. 2019.
- SALVI, N. C.; DEOPURKAR, R. L.; WAGHMARE, A. B.; KHADILKAR, M. V.; KALOLIKAR, M. Y.; GADE, S. K.; MOHITE, L. S. Validation of indirect ELISA for quantitative testing of rabies antibodies during production of Antirabies serum using equines. *Procedia in Vaccinology* 2, p. 3-11, 2010.