

CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM CONTROLE DA QUALIDADE DE PRODUTOS,
AMBIENTES E SERVIÇOS VINCULADOS À VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Elaine Cristina de Freitas Oliveira

**CONTROLE DA QUALIDADE DO PLASMA HIPERIMUNE EQUINO
ANTIBOTRÓPICO
PRODUZIDO NO INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO**

Rio de Janeiro

2013

Elaine Cristina de Freitas Oliveira

CONTROLE DA QUALIDADE DO PLASMA HIPERIMUNE EQUINO
ANTIBOTRÓPICO PRODUZIDO NO INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Maria Aparecida Affonso Boller

Rio de Janeiro

2013

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Oliveira, Eliane Cristina de Freitas

Controle da qualidade do plasma hiperimune equino antiostróico produzido no Instituto de Biologia do Exército / Eliane Cristina de Freitas: INCQS/FIOCRUZ, 2013.

46 f.: il., tab.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Vigilância Sanitária) – Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz, 2013.

Orientadora: Maria Aparecida Affonso Boller

1. Antivenenos. 2. Soros Imunes. 3. Bothrops. 4. Controle de Qualidade. I. Título

Elaine Cristina de Freitas Oliveira

**CONTROLE DA QUALIDADE DO PLASMA HIPERIMUNE EQUINO
ANTIBOTRÓPICO PRODUZIDO NO INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Aprovado em 09/07/2013

BANCA EXAMINADORA

Humberto Pinheiro de Araújo - Doutor
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Elizabeth Porto Reis Lucas - Mestre
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Alexandre Alves de Souza de Oliveira Dias - Doutor
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho aos equinos que,
literalmente, doam sangue para salvar vidas.

AGRADECIMENTOS

A Deus que permitiu que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais que me ensinaram a lutar pelos meus sonhos.

Ao meu marido que compreendeu as minhas horas de ausência.

Ao Exército Brasileiro que tornou esse trabalho possível.

À minha orientadora que me guiou e apoiou em todos os momentos.

Aos professores e coordenadoras do Curso de Especialização pela dedicação e lições ensinadas.

Aos colegas pelos momentos de alegria, dúvidas e ensinamentos compartilhados.

Aos equinos que participaram deste trabalho.

A todos aqueles que de algum modo contribuíram para esse trabalho.

RESUMO

Os acidentes ofídicos têm importância em saúde pública em virtude de sua grande frequência e gravidade. O tratamento para esses acidentes consiste na administração de soro antiofídico, cuja matéria-prima é o plasma hiperimune equino de animais hiperimunizados contra o veneno ofídico. Para a avaliação da qualidade do plasma hiperimune equino antiofídico produzido no Instituto de Biologia do Exército através da determinação da potência desse plasma foram utilizados quarenta equinos, obedecendo ao protocolo de produção recebido do Instituto Butantan. As amostras de sangue dos cavalos foram colhidas no 22º dia de cada ciclo. Foi realizada a prova de atividade (potência) em um pool dessas amostras o que permitiu calcular e determinar a potência do plasma. A pesquisa durou quatro ciclos de produção do ano de 2012. Foi feita uma comparação da potência do plasma de cada ciclo de produção com o que preconiza a legislação e a Farmacopeia Brasileira. Em todos os ciclos de produção, a potência do plasma hiperimune equino antiofídico ficou acima do limite mínimo especificado pela legislação e pela Farmacopeia Brasileira. A pesquisa proposta permitiu concluir que o plasma hiperimune equino antiofídico produzido no Instituto de Biologia do Exército no ano de 2012 está dentro do padrão de qualidade estabelecido pela legislação.

Palavras-chaves: Controle da qualidade. Plasma hiperimune equino antiofídico. Potência do plasma.

ABSTRACT

Ophidian accidents have public health significance because of its high frequency and severity. The treatment of these accidents comprises administering antiophidic serum, whose raw material is the equine hyperimmune plasma of animals hyperimmunized to snake venom. To assess the quality of the equine hyperimmune plasma antivenom produced at the Army Institute of Biology, by determining the power of this plasma, forty horses were used, obeying the production protocol received from Butantan Institute. The horses' blood samples were collected on the 22nd day of each cycle. The test activity (potency) was carried out in the pool of those samples, which allowed calculating and determining the power of the plasma. The study lasted four cycles of production of the year 2012. A comparison of the plasma potency of each production cycle was conducted according to the Brazilian legislation and Pharmacopoeia. In all production cycles, the potency of equine hyperimmune plasma antivenom was above the minimum specified by law and by the Brazilian Pharmacopoeia. The proposed research concluded that equine hyperimmune plasma antivenom produced at the Army Institute of Biology in the year 2012 is employed with the quality standards established by law.

Key words: Quality control. Equine hyperimmune plasma antivenom. Plasma potency.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 Procedência das notificações segundo as regiões fisiográficas, Brasil, 2007 - 2010	13
Gráfico 2 Distribuição dos acidentes ofídicos segundo o gênero da serpente peçonhenta, Brasil, 2007 - 2010	14
Gráfico 3 Letalidade dos acidentes ofídicos por região fisiográfica, Brasil, 2007 - 2010	15
Figura 1 <i>Bothrops alternatus</i> e distribuição geográfica	17
Figura 2 <i>Bothrops atrox</i> e distribuição geográfica	17
Figura 3 <i>Bothrops erythromelas</i> e distribuição geográfica	17
Figura 4 <i>Bothrops jararaca</i> e distribuição geográfica	18
Figura 5 <i>Bothrops jararacussu</i> e distribuição geográfica	18
Figura 6 <i>Bothrops moojeni</i> e distribuição geográfica	18
Figura 7 <i>Bothrops neuwidi</i> e distribuição geográfica	19
Quadro 1 Acidente botrópico: classificação quanto à gravidade e soroterapia recomendada	22
Figura 8 Produção de Plasma Hiperimune Equino no IBEx	26
Quadro 2 Protocolo de Produção de Plasma Hiperimune do IBEx	30
Quadro 3 Resultado da Prova de Potência do Plasma Hiperimune Antibotrópico do 1º Ciclo de Produção de 2012	36
Quadro 4 Resultado da Prova de Potência do Plasma Hiperimune Antibotrópico do 2º Ciclo de Produção de 2012	36
Quadro 5 Resultado da Prova de Potência do Plasma Hiperimune Antibotrópico do 3º Ciclo de Produção de 2012	37
Quadro 6 Resultado da Prova de Potência do Plasma Hiperimune Antibotrópico do 4º Ciclo de Produção de 2012	37
Quadro 7 Comparação entre a potência do plasma hiperimune antibotrópico produzido no IBEx nos ciclos de 2012 e a potência mínima exigida pela legislação	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Coeficientes de incidência anual (por 100.000 habitantes) dos acidentes ofídicos por região fisiográfica, Brasil, 2007 - 2010	13
Tabela 2 Distribuição dos acidentes ofídicos, segundo o gênero da serpente envolvida, Brasil, 2007 - 2010	14
Tabela 3 Letalidade dos acidentes ofídicos por gênero de serpente, Brasil, 2007 - 2010	15

LISTA DE SIGLAS

EMI	Emulsão Múltipla Incompleta
FMG	Fazenda Modelo Gericinó
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
IB	Instituto Butantan
IBEx	Instituto de Biologia do Exército
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IVB	Instituto Vital Brazil
PBS	Phosphate Buffered Solution
SABC	Soro Antibotrópico-Crotálico
SABL	Soro Antibotrópico-Laquélico
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas
TecPar	Instituto de Tecnologia do Paraná

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 ACIDENTES OFÍDICOS.....	11
1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	12
1.3 ACIDENTE BOTRÓPICO.....	16
1.3.1 Ações do veneno.....	19
1.3.2 Quadro clínico	21
1.3.3 Tratamento	21
1.4 A PRODUÇÃO DE SORO ANTIOFÍDICO NO BRASIL.....	22
1.5 A PRODUÇÃO DE PLASMA HIPERIMUNE EQUINO NO INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO.....	25
1.6 JUSTIFICATIVA	26
2 OBJETIVO GERAL	28
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	29
3.1.1 Seleção de animais	29
3.1.2 Identificação dos animais	29
3.2 PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE PLASMA HIPERIMUNE	30
3.2.1 Preparo e inoculação do antígeno.....	30
3.2.2 Sangrias	31
3.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS DE SANGUE PARA A PROVA DE POTÊNCIA ..	32
3.4 PROVA DE POTÊNCIA.....	32
3.4.1 Preparo da amostra.....	32
3.4.2 Preparo dos animais.....	33
3.4.3 Inoculação e observação dos animais.....	33
3.4.4 Cálculo da DE ₅₀ e da potência.....	33
4 RESULTADOS	35
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO.....	411
REFERÊNCIAS.....	422

1 INTRODUÇÃO

1.1 ACIDENTES OFÍDICOS

Os acidentes com animais peçonhentos, em especial, os causados por serpentes, constituem um problema de saúde pública, sobretudo nos países das regiões tropicais e subtropicais, quer pela quantidade ou gravidade de muitos deles (QUEIROZ, 2005).

Segundo Cardoso e Wen (2003) o temor pelas serpentes e outros animais peçonhentos remota dos tempos do Brasil-Colônia e foi registrado na célebre carta do jesuíta José de Anchieta escrita em 1560 em São Vicente, onde ele relata a existência de “diversos gêneros de cobras venenosas” e a ocorrência de acidentes. Foram encontrados alguns registros de acidentes ocorridos no período colonial como, por exemplo, o óbito de um homem em São Paulo em 1793 por picada de cobra. Dados da Santa Casa do Rio de Janeiro referente a óbitos do ano de 1838 atribuem um caso à picada de cobra. A princesa Isabel escreveu em seu diário, em 8 de novembro de 1884, que o então príncipe herdeiro da coroa do Brasil, D. Pedro de Orleans e Bragança, quase sofreu um acidente provocado por jararacas.

De acordo com Lucas (2009 apud DIAS, 1966), João Batista Lacerda foi um dos pioneiros no estudo do ofidismo na América Latina. No Museu Nacional do Rio de Janeiro, onde ingressou na década de 1870, realizou trabalhos sobre toxicologia dos venenos e sistemática ofídica, identificando novas espécies da fauna brasileira.

Vital Brazil, durante os anos de 1890, observou um grande número de acidentes por serpentes e baseado nos trabalhos de Albert Calmette em soroterapia, acaba por criar o soro anticrotálico. Em 1899, na Fazenda Butantan, instala os primeiros laboratórios onde produziria soros contra o veneno de todas as serpentes no Brasil (OLIVEIRA, 2004a).

No Brasil existem 381 espécies de serpentes, classificadas dentro de uns 80 gêneros, reunidas em 10 famílias (BÉRNILS; COSTA, 2012). Apenas 2 famílias (Elapidae e Viperidae) congregam as espécies peçonhentas, isto é, aquelas que produzem toxinas em glândulas especializadas e têm aparelhos apropriados para inoculá-las, ocasionando intoxicações sérias no homem e animais domésticos

(MELGAREJO, 2003). A peçonha é produzida e mantida em um par de glândulas localizadas na base da cabeça; um canal liga a glândula à base frontal da presa, que é oca e permite a transferência de peçonha à vítima; músculos ao redor da glândula se contraem no momento da picada fazendo com que a peçonha penetre na vítima (BORGES, 2001).

Segundo França e Málaque (2003), as peçonhas de serpentes são compostas por mais de vinte substâncias diferentes, sendo que mais de 90% por proteínas, como várias enzimas, toxinas não enzimáticas e proteínas não tóxicas. Entre as frações não-protéicas encontramos carboidratos, lipídios, metais (glicoproteínas e enzimas metaloprotéicas), aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres.

De acordo com Borges (2001), geralmente o tipo de ação da peçonha é o mesmo dentro de um mesmo gênero, mas podem ocorrer variações da composição da peçonha por características ontogênicas (idade da serpente), sazonais (época do ano) e regionais (distribuição geográfica da serpente).

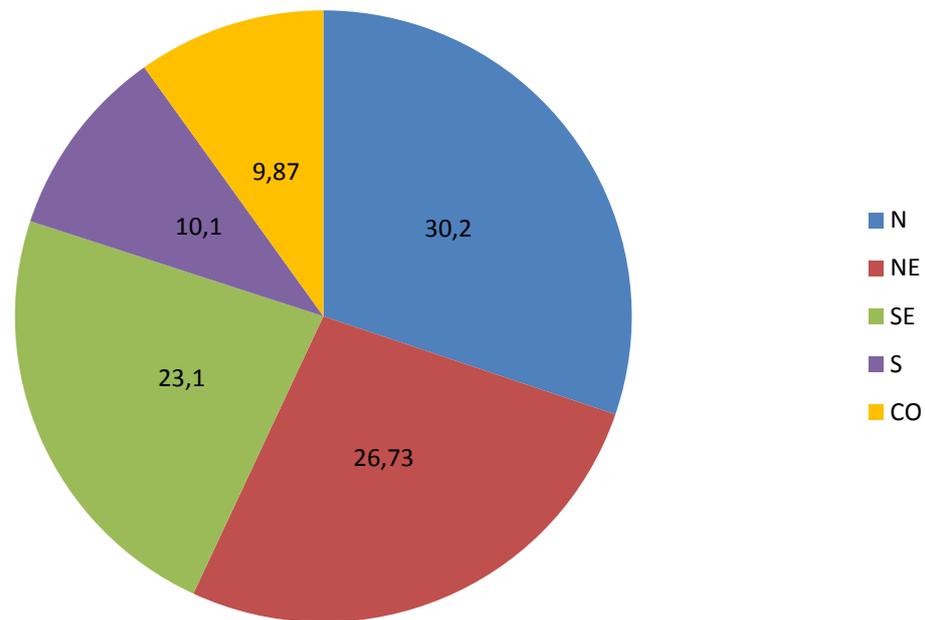
Acidente ofídico é o envenenamento causado pela inoculação de toxinas, através das presas de serpentes (aparelho inoculador), podendo determinar alterações locais (na região da picada) e sistêmicas (BRASIL, 2009).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

No Brasil, quatro tipos de acidente são considerados de interesse em saúde: botrópico, crotálico, laquétrico e elapídico. Acidentes por serpentes não peçonhentas são relativamente frequentes, porém não determinam acidentes graves, na maioria dos casos e, por isso, são considerados de menor importância médica (BRASIL, 2009).

Foram notificados ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), entre os anos de 2007 e 2010, 114.555 acidentes ofídicos, o que representa uma média de 28.639 casos / ano para o país. A maioria das notificações procedeu das Regiões Norte e Nordeste como mostra o gráfico 1.

Gráfico 1 - Procedência das notificações segundo as regiões fisiográficas, Brasil, 2007-2010



fonte: (SINAN/SVS/MS, 2012)

Nos 114.555 casos de acidentes ofídicos notificados no período, o coeficiente de incidência para o Brasil foi de 15,12 acidentes/100.000 habitantes. Nas diferentes regiões do país, a maior média foi no Norte, como se observa na Tabela 1.

Tabela 1 - Coeficientes de incidência anual (por 100.000 habitantes) dos acidentes ofídicos por região fisiográfica, Brasil, 2007-2010

REGIÃO	2007	2008	2009	2010	TOTAL
Brasil	14,4	14,9	15,7	15,5	15,12
Norte	52,7	55,8	60,1	57,9	56,62
Nordeste	13,4	13,3	15,8	15,5	14,50
Sudeste	8,4	8,8	7,9	7,9	8,25
Sul	11,2	10,3	10,7	9,9	10,53
Centro-Oeste	17,5	20,9	21,3	22,4	20,53

fonte: (SINAN/SVS/MS, 2011)

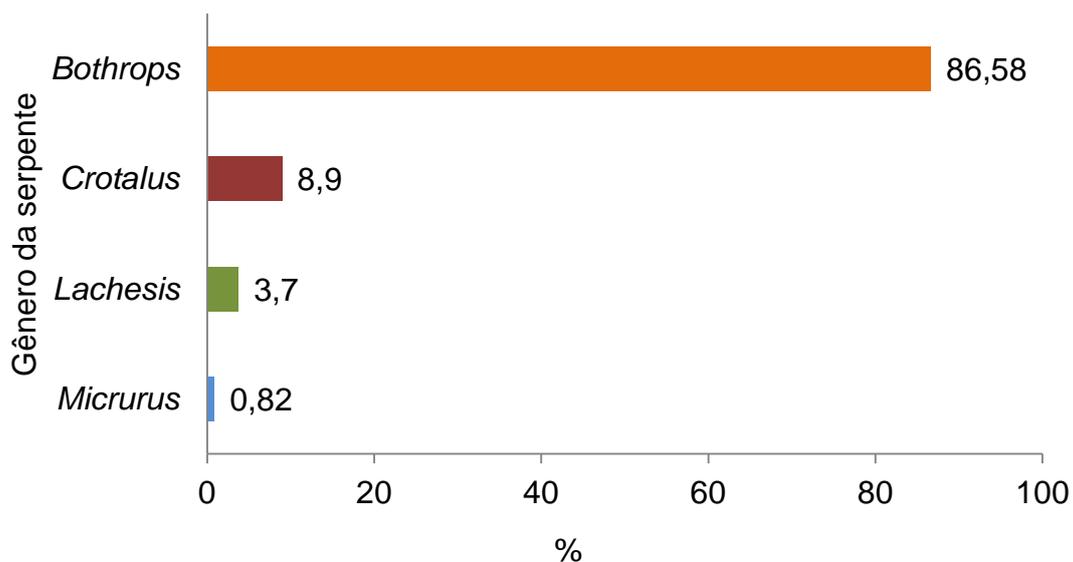
Em 11,85% das 114.555 notificações, o gênero da serpente envolvida não foi informado (Tabela 2). Nos 96.519 casos de acidentes por serpente peçonhenta a distribuição dos acidentes, de acordo com o gênero da serpente envolvida, pode ser observada no gráfico 2.

Tabela 2 - Distribuição dos acidentes ofídicos, segundo o gênero da serpente envolvido, Brasil, 2007-2010

DISTRIBUIÇÃO	Nº ACIDENTES	%
<i>Bothrops</i>	83.564	72,95
<i>Crotalus</i>	8.596	7,50
<i>Lachesis</i>	3.568	3,12
<i>Micrurus</i>	791	0,69
Não informados	13.579	11,85
Não peçonhentos	4.457	3,89

fonte: (SINAN/SVS/MS, 2012)

Gráfico 2 - Distribuição dos acidentes ofídicos segundo o gênero da serpente peçonhenta, Brasil, 2007-2010.



fonte: (SINAN/SVS/MS, 2012)

Em 63,13% das notificações, a idade dos acidentados variou de 20 a 59 anos, que corresponde ao grupo etário onde se encontra a força de trabalho. O sexo masculino foi acometido em 77,51% dos acidentes, o feminino em 22,48% e, em 0,01% o sexo não foi informado.

Dos 114.555 casos notificados, houve registro de 509 óbitos. Excluindo-se os casos informados como “não-peçonhentos”, a letalidade geral para o Brasil foi de 0,46%.

O maior índice foi observado nos acidentes por *Crotalus*, onde em 8.596 acidentes ocorreram 90 óbitos (1,05%). (Tabela 3)

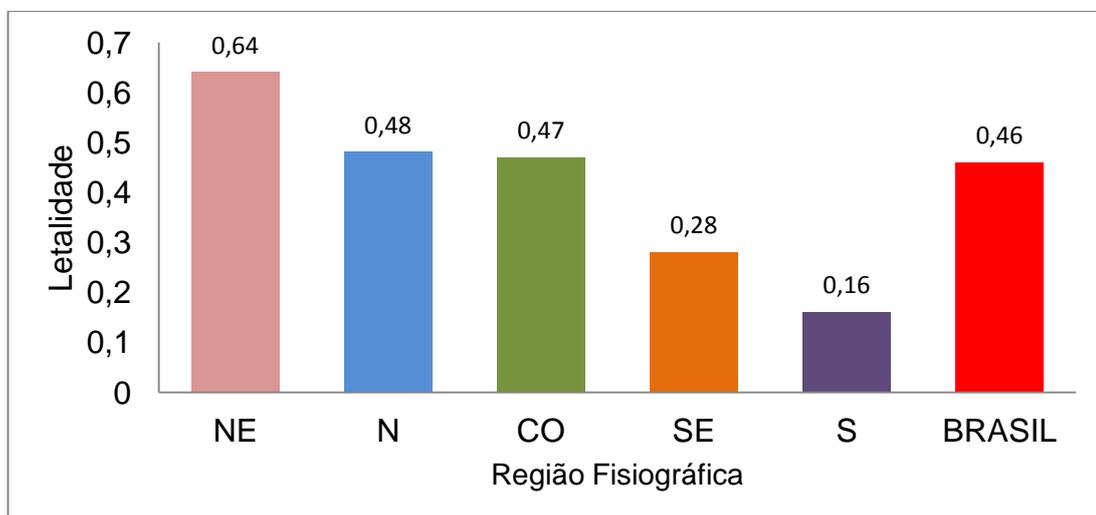
Tabela 3 - Letalidade dos acidentes ofídicos por gênero de serpente, Brasil, 2007-2010.

GÊNERO	Nº CASOS	Nº ÓBITOS	LETALIDADE (%)
<i>Bothrops</i>	83.564	329	0,39
<i>Crotalus</i>	8.596	90	1,05
<i>Lachesis</i>	3.568	24	0,67
<i>Micrurus</i>	791	3	0,38
Não informado	13.579	59	0,43
Não peçonhento	4.457	4	0,09

fonte: (SINAN/SVS/MS, 2012)

A letalidade do acidente ofídico não se mostrou uniforme nas regiões fisiográficas, como se observa no gráfico 3. O maior índice foi registrado no Nordeste.

Gráfico 3 - Letalidade dos acidentes ofídicos por região fisiográfica, Brasil, 2007-2010.



fonte: (SINAN/SVS/MS, 2012)

Dos 509 óbitos notificados, em 450 foi informado o tempo decorrido entre a picada e o atendimento. Destes, em 271 (60,22%), o atendimento foi realizado nas primeiras 6 horas após a picada, enquanto que em 179 (39,78%) depois de 6 horas da ocorrência do acidente (SINAN, 2012).

1.3 ACIDENTE BOTRÓPICO

As serpentes do gênero *Bothrops* (família Viperidae) são encontradas em todo território nacional e contém mais de 30 espécies e subespécies (FRANÇA; MÁLAQUE, 2003). São responsáveis pelo maior número de acidentes ofídicos no Brasil (OLIVEIRA, 2004b). A amplitude de acidentes pode ser atribuída ao seu comportamento agressivo, assim como à sua ampla distribuição geográfica (BORGES, 2001).

São conhecidas popularmente por jararaca, ouricana, jararacuçu, urutu-cruzeira, jararaca-do-rabo-branco, malha-de-sapo, patrona, surucucurana, comboia, caiçaca e outras denominações (BRASIL, 2001).

Estas serpentes habitam principalmente zonas rurais e periferias de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores (paióis, celeiros, depósitos de lenha) (BRASIL, 2001). Vivem nos mais diferentes locais, em cima de árvores, enterradas, entocadas, nas margens dos rios e em baixadas, cerrados, matas e capoeiras (OLIVEIRA, 2004b).

Têm hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares e quando se sentem ameaçadas podem desferir botes sem produzir ruídos (BRASIL, 2001). Seu tamanho, quando adultas varia de 40 centímetros a dois metros e possuem dentição do tipo solenóglifa (OLIVEIRA, 2004b).

De acordo com Melgarejo (2003), as espécies de *Bothrops* mais significativas para a saúde pública são: *Bothrops alternatus*, *Bothrops atrox*, *Bothrops erythromelas*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops leucurus*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwidi* (Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7).

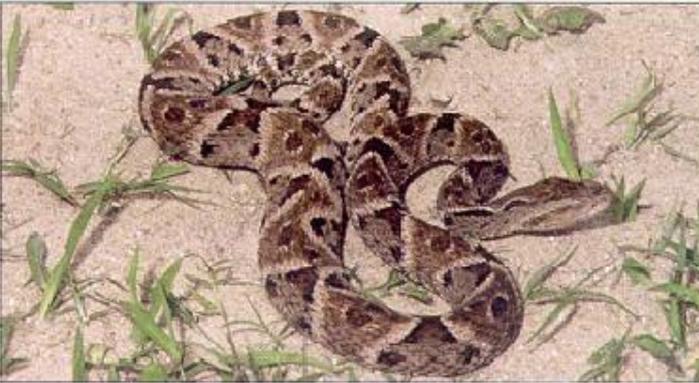
Figura 1 - *Bothrops alternatus* e distribuição geográfica



fonte: (BRASIL, 2001)



Figura 2 - *Bothrops atrox* e distribuição geográfica



fonte: (BRASIL, 2001)



Figura 3 - *Bothrops erythromelas* e distribuição geográfica



fonte: (BRASIL, 2001)



Figura 4 - *Bothrops jararaca* e distribuição geográfica



fonte: (BRASIL, 2001)



Figura 5 - *Bothrops jararacussu* e distribuição geográfica



fonte: (BRASIL, 2001)



Figura 6 - *Bothrops moojeni* e distribuição geográfica



fonte: (BRASIL, 2001)



Figura7 - *Bothrops neuwiedi* e distribuição geográfica



fonte: (BRASIL, 2001)



1.3.1 Ações do veneno

Os venenos das serpentes da família Viperidae apresentam grandes variações nas suas composições mas os componentes que apresentam as maiores concentrações são metaloproteinases zinco-dependentes, fosfolipases A₂ e serinas endopeptidases. Além disso, estes venenos contêm bradicinina potenciador de peptídeos, proteínas semelhantes a lectina C, L-aminoácido oxidase e várias outras enzimas (GUTIERREZ, 2012).

Os envenenamentos causados por viperídeos possuem uma fisiopatologia complexa, que inclui efeitos locais como mionecrose, dermonecrose, hemorragia, edema, dor; e, em casos moderados e graves, alterações sistêmicas como coagulopatia, sangramento, choque e insuficiência renal aguda (GUTIERREZ; LOMONTE, 2003).

O veneno botrópico tem três atividades fisiopatológicas: proteolítica ou inflamatória aguda, coagulante e hemorrágica, sendo que elas podem ser causadas por componentes específicos, sinergia entre toxinas e, ainda, uma única toxina pode ter várias atividades (FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

1.3.1.1 Ação proteolítica ou inflamatória aguda

As lesões locais, como edema, bolhas e necrose, atribuídas inicialmente a atividade proteolítica têm patogênese complexa (BRASIL, 2001). São causadas por um conjunto de frações do veneno botrópico como aminas biogênicas pré-formadas do tipo histamina, pequenos peptídeos ou proteínas como a fosfolipase A₂, esterases, proteases, enzimas liberadores de cininas e lectinas (FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

1.3.1.2 Ação coagulante

A maioria das serpentes do gênero *Bothrops* possui, isolada ou simultaneamente, substâncias capazes de ativar fibrinogênio, protrombina e fator X. Possui também ação semelhante à trombina, convertendo o fibrinogênio em fibrina. Essas ações produzem distúrbios da coagulação, caracterizados por consumo dos seus fatores, geração de produtos de degradação da fibrina e fibrinogênio, induzindo frequentemente, incoagulabilidade sanguínea. Também podem levar a alterações da função plaquetária e trombocitopenia (BRASIL, 2001; FRANÇA; MÁLQUE, 2003).

1.3.1.3 Ação hemorrágica

Decorrente de componentes específicos como hemorraginas e metaloproteinases zinco-dependentes que provocam lesões na membrana basal dos capilares, associada a trombocitopenia e alterações da coagulação (BRASIL, 2001; FRANÇA; MÁLQUE, 2003).

1.3.2 Quadro clínico

As manifestações locais são caracterizadas pela dor e edema no local da picada, de intensidade variável e, em geral, de instalação precoce e caráter progressivo. O sangramento no sítio de inoculação do veneno é frequentemente observado. A equimose no local da picada pode acometer porção extensa do membro. Infartamento ganglionar e bolhas podem aparecer na evolução, acompanhadas ou não de necrose (BRASIL, 2001; FRANÇA; MÁLAQUE, 2003)

As manifestações sistêmicas incluem sangramentos sendo os mais comuns gengivorragia, hematúria microscópica, púrpuras e sangramento em feridas recentes, e menos frequentes, hematúria macroscópica, hemoptise, epistaxe, sangramento conjuntival, hipermenorragia e hematemêse (FRANÇA; MÁLAQUE, 2003). Sintomas inespecíficos como náuseas, vômitos, sudorese, hipotensão arterial e, mais raramente, choque, também pode ocorrer (BRASIL, 2001).

As principais complicações locais são abscesso, necrose e síndrome compartimental (FRANÇA; MÁLAQUE, 2003) e as complicações sistêmicas são insuficiência renal aguda e choque (BRASIL, 2001).

1.3.3 Tratamento

O tratamento específico consiste na administração, o mais precocemente possível, do soro antitoxínico (SAB) por via intravenosa, em solução diluída em soro fisiológico ou glicosado. Na falta do soro antitoxínico, pode-se utilizar o soro antitoxínico-crotálico (SABC) ou antitoxínico-laquétrico (SABL). Cada ampola de soro antitoxínico contém 10 mL e neutraliza no mínimo 50 mg de veneno-referência de *Bothrops jararaca* (BRASIL, 2001; FRANÇA; MÁLAQUE, 2003). A posologia está indicada no Quadro 1.

Quadro 1 - Acidente botrópico: classificação quanto à gravidade e soroterapia recomendada

MANIFESTAÇÕES E TRATAMENTO	CLASSIFICAÇÃO		
	LEVE	MODERADA	GRAVE
Locais: <ul style="list-style-type: none"> • dor • edema • equimose 	ausentes ou discretas	evidentes	intensas
Sistêmicas: <ul style="list-style-type: none"> • hemorragia grave • choque • anúria 	ausentes	ausentes	presentes
Tempo de Coagulação	normal ou alterado	normal ou alterado	normal ou alterado
Soroterapia (nº de ampolas)	2 – 4	4 - 8	12
Via de administração	intravenosa		

Fonte: BRASIL, 2001

O tratamento geral baseia-se na administração de antibióticos, analgésicos, manutenção da hidratação e profilaxia do tétano. Caso haja complicações locais, estas devem ser tratadas com debridamento cirúrgico e fasciotomia.

1.4 A PRODUÇÃO DE SORO ANTIOFÍDICO NO BRASIL

A utilização de soroterapia para o tratamento de acidentes por animais peçonhentos data das últimas décadas do século XIX e a produção de soros antitoxinas animais ainda é baseada nos métodos originalmente descritos por Vital Brazil. A soroterapia foi desde então introduzida como tratamento para acidentes ofídicos no Brasil (CARDOSO; YAMAGUCHI; SILVA, 2003).

No início do século XX, a especificidade dos soros antiofídicos já estava sendo reconhecida mundialmente, graças aos esforços de Vital Brazil. A saúde pública brasileira contava com várias instituições que se estruturavam e eram fundamentais para as ações de imunizações: o Instituto Soroterápico de

Manguinhos/RJ (mais tarde Instituto Oswaldo Cruz); o Laboratório de Produção de Soro Antipestoso (mais tarde Instituto Serumtherápico e depois Instituto Butantan/SP); o Laboratório Farmacêutico do Estado do Rio de Janeiro (mais tarde Instituto Vital Brazil/RJ); a Fundação Ataulpho de Paiva/RJ; o Instituto Experimental do Norte (mais tarde Instituto Evandro Chagas/PA) e o Instituto de Tecnologia do Paraná (TecPar) (TEMPORÃO et al, 2005).

Porém, até 1985 o soro antiofídico para uso humano não fazia parte do Programa Nacional de Imunizações do Ministério da Saúde embora o Brasil tivesse muito casos de acidentes ofídicos. Durante a década de 1970 esta situação foi agravada pela falta generalizada de soros antiofídicos, fato que foi relatado pela mídia escrita entre 1978 e 1985, com consequentes mortes (QUEIROZ, 2005).

Essa crise foi desencadeada pela saída do laboratório privado Syntex do Brasil, em 1983, que fabricava 300 mil ampolas anuais. Essa saída ocorreu devido ao Ministério da Saúde ter detectado falhas no processo de produção da vacina DPT (difteria e tétano), o que interferiu diretamente na produção de soros antiofídicos. Os laboratórios oficiais – Instituto Butantan (SP), Instituto Vital Brazil (RJ) e Fundação Ezequiel Dias (MG) - passaram a ser responsáveis pela produção do soro antiofídico (QUEIROZ, 2005).

Em 1984, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) implantou o Sistema de Controle de Qualidade dos Imunobiológicos em nível nacional e constatou a qualidade inadequada dos soros nacionais, motivada principalmente pela precariedade dos laboratórios produtores (CARDOSO; YAMAGUCHI; SILVA, 2003).

Esses fatos levaram o Ministério da Saúde a implantar, em junho de 1986, o Programa Nacional de Ofidismo, coordenado pela Secretaria Nacional de Ações Básicas em Saúde. A partir daí, os acidentes ofídicos passaram a ser de notificação compulsória no país (QUEIROZ, 2005).

Foi criado, também, o Programa Nacional de Auto-Suficiência em Imunobiológicos (soros e vacinas), para investir na construção de novos laboratórios conforme as exigências das normas de boas práticas de fabricação e biossegurança (CARDOSO; YAMAGUCHI; SILVA, 2003).

Atualmente os soros produzidos para uso humano são fabricados em quatro centros de pesquisas: Instituto Butantan (SP); Fundação Ezequiel Dias (MG); Instituto Vital Brazil (RJ) e Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológicos (PR).

A produção desses soros é comprada pelo Ministério da Saúde e enviada às Secretarias Estaduais para ser distribuídas nos polos de aplicação de soro (QUEIROZ, 2005).

Segundo Cardoso; Yamaguchi; Silva (2003), a produção de soros antiofídicos ainda é baseada nos métodos originalmente descritos. Animais de grande porte são imunizados com venenos de uma ou mais espécies de animais peçonhentos de importância médica. O soro desses animais contém os anticorpos com capacidade de neutralizar as toxinas dos venenos. Para que um soro seja eficiente na neutralização dos efeitos tóxicos de um veneno animal é necessário que ele contenha anticorpos dirigidos contra as principais toxinas responsáveis por sua ação sistêmica e local. Dessa forma, a escolha dos antígenos utilizados na imunização dos animais é um fator primordial para a obtenção dos produtos ativos.

De acordo com as Normas de Produção e Controle de Qualidade dos Soros Antiofídicos (BRASIL, 1996), “o soro antiofídico é uma solução de imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de equídeos hiperimunizados, contra o veneno da espécie a que se refere”.

A purificação do soro é feita a partir do plasma hiperimune por precipitação com sulfato de amônio, fracionamento enzimático e termocoagulação. O sulfato de amônio é removido do soro purificado por meio de diálise, utilizando sistema de ultrafiltros moleculares. O soro purificado é concentrado, submetido a filtração clarificante e esterilizante, e mantido em frascos estéreis a temperatura de 2 a 8°C (CARDOSO; YAMAGUCHI; SILVA, 2003). A purificação de alguns soros é completada por cromatografia (HIGASHI; RAW; MERCADANTE, 2005).

Após ser aprovado nos testes de controle da qualidade, o soro é diluído, adicionado de conservante (fenol), isotonzado, tem seu pH ajustado entre 6 e 7 e é submetido novamente a filtração esterilizante. O produto obtido é submetido a testes de controle da qualidade tais como testes microbiológicos, biológicos e físico-químicos e envasado em ampolas onde os testes de controle são repetidos. Uma amostra do lote de soro é enviada ao laboratório de referência nacional para controle da qualidade – o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) – que, após a realização dos mesmos tipos de testes de controle, emite o laudo final do produto para consumo (CARDOSO; YAMAGUCHI; SILVA, 2003).

Segundo a Farmacopéia Brasileira (2010), “Para assegurar a qualidade do produto nas diversas fases de processamento, devem ser realizados testes de esterilidade, pH, proteínas, atividade ou potência por métodos *in vitro* ou *in vivo*”.

Além destes testes citados acima, os outros realizados são: pirogênio, determinação de fenol, determinação de sólidos totais, determinação de sulfato de amônio, determinação de cloreto de sódio, prova de inocuidade, prova de identidade, controle de volume médio e inspeção visual (BRASIL, 1996).

O lote final do soro antiofídico deve ser mantido à temperatura de 4 a 8°C e o prazo de validade é de 36 meses a partir da data da última determinação de potência realizada pelo produtor (BRASIL, 1996).

1.5 A PRODUÇÃO DE PLASMA HIPERIMUNE EQUINO NO INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO

O Instituto de Biologia do Exército (IBEx) faz parte do Programa de Auto-Suficiência em Imunobiológicos do Ministério da Saúde. Em convênio firmado inicialmente com o Instituto Vital Brazil (IVB) no ano de 1993, juntamente com a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) foi viabilizada, com recursos do Ministério da Saúde, a construção da Fazenda Modelo Gericinó (FMG) para acomodação da tropa de equinos e a construção do biotério e do serpentário localizados no IBEx. A parceria com o IVB durou até 1998, quando então foi iniciado o atual convênio com o Instituto Butantan (IB). Cabe à Divisão Veterinária esta importante missão, sendo de sua responsabilidade a produção de plasma hiperimune equino, matéria-prima dos soros antiofídicos, que é fornecido ao Instituto Butantan (IBEX, 2013).

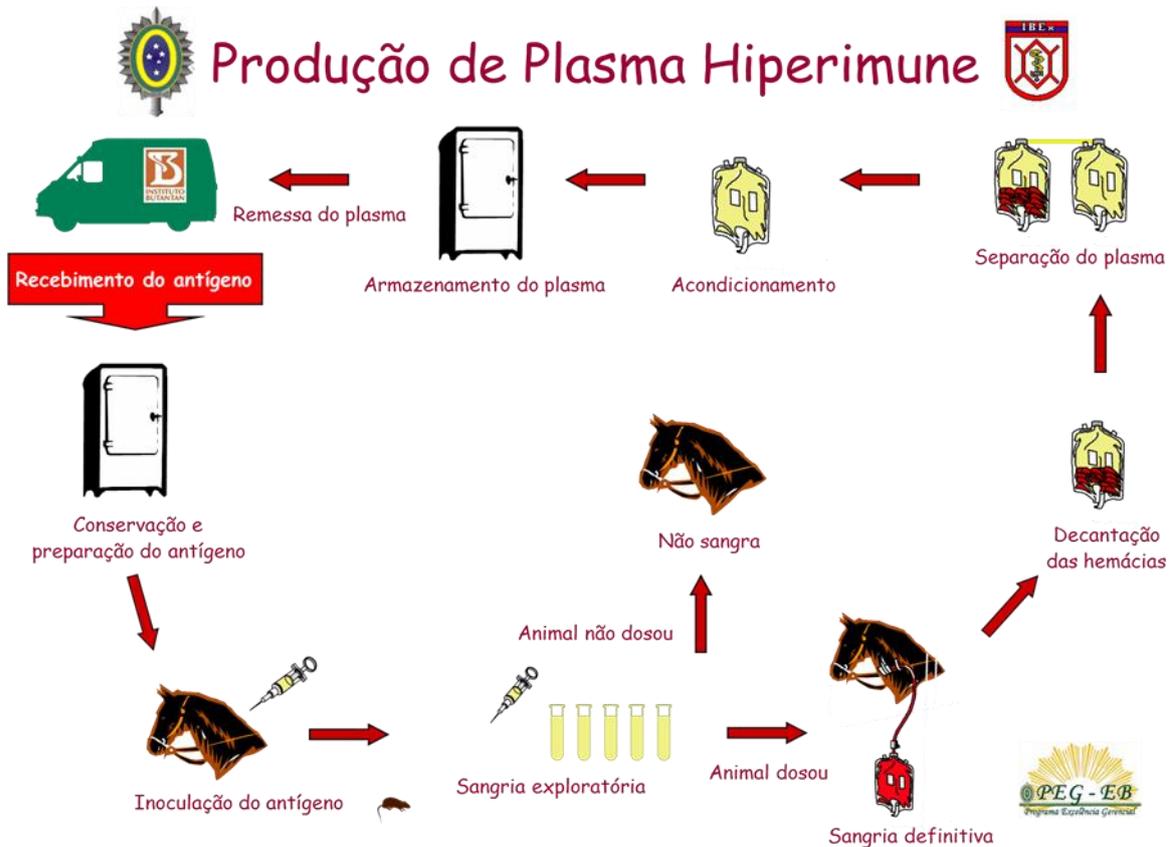
O antígeno é recebido do Instituto Butantan e preparado no dia de cada inoculação. Os animais que forem considerados aptos após o exame clínico e resultado do hematócrito são pesados e inoculados com o antígeno específico.

É realizada uma sangria exploratória, onde se coleta soro sanguíneo de cada animal inoculado para realização da prova de potência. Se o animal não produziu anticorpos suficientes ele não é submetido à sangria definitiva também chamada de sangria de produção. Se o animal produziu anticorpos adequadamente, ele é submetido à sangria de produção.

O sangue é coletado em uma bolsa plástica dupla que é armazenada em uma câmara frigorífica por 48 horas para ocorrer a decantação das hemácias. Após, há a separação dos elementos figurados do plasma, que é recolhido no segundo compartimento da bolsa de sangue, em um sistema totalmente fechado e esterilizado. É realizada a plasmaferese em cada animal que foi submetido à sangria definitiva.

O plasma fica armazenado em uma câmara frigorífica até ser recolhido pelo Instituto Butantan (Figura 8).

Figura 8 - Produção de Plasma Hiperimune Equino no IBEx



fonte: IBEx, 2013

1.6 JUSTIFICATIVA

A preocupação com o envenenamento ofídico e seu tratamento é bastante antiga. No Brasil, já durante o período da colonização, o ofidismo era considerado

responsável por um número significativo de óbitos, sendo catalogado como uma das grandes pragas existentes até então (WEN, 2003).

Os acidentes por animais peçonhentos vêm aumentando nos últimos anos. Em 2010, os envenenamentos por animais peçonhentos foram a segunda maior causa de intoxicações em humanos (22,73%) segundo os casos notificados ao Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas (SINITOX, 2013). Dentre estes, destacam-se os acidentes ofídicos que têm importância médica em virtude de sua grande frequência e gravidade. O acidente botrópico corresponde ao acidente ofídico de maior importância epidemiológica no país, pois é responsável por mais de 70% dos envenenamentos (BRASIL, 2001).

O soro antiofídico é um passo fundamental no tratamento adequado dos pacientes picados por serpentes, sendo a principal terapia para esse tipo de acidente (BRASIL, 2001).

Sendo um imunobiológico, o soro antiofídico tem que ser seguro, de qualidade e eficácia comprovadas (MIRANDA; HENRIQUES, 2005). Para isso, precisa ser produzido de acordo com normas técnicas gerais de produção e de controle da qualidade. O produto só pode ser liberado para consumo após a aprovação e a emissão do laudo final pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (CARDOSO; YAMAGUCHI; SILVA, 2003).

Para que o produto final – o soro antiofídico – seja de qualidade é fundamental que a matéria-prima – o plasma hiperimune equino – tenha qualidade. O controle do plasma individual é feito através da prova da atividade (potência), onde precisa alcançar um título neutralizante mínimo, que é o que vai ser pesquisado neste trabalho.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho é avaliar a qualidade do plasma hiperimune equino antibotrópico produzido no Instituto de Biologia do Exército no ano de 2012.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a potência do plasma hiperimune equino antibotrópico produzido no Instituto de Biologia do Exército;
- Analisar se a potência do plasma hiperimune equino antibotrópico produzido no Instituto de Biologia do Exército está dentro do padrão estabelecido pela legislação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para uma melhor compreensão dos métodos utilizados nesse estudo os itens a seguir descrevem como se realizou a seleção de animais, o protocolo de produção do plasma hiperimune, a colheita das amostras de sangue e como foi feita a prova de potência.

3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

3.1.1 Seleção de animais

O grupo de animais escolhidos para essa pesquisa foi de equinos produtores de plasma hiperimune antibotrópico da Fazenda Modelo Gericinó do Instituto de Biologia do Exército, composto por 40 cavalos, machos castrados e fêmeas, com idade entre 13 e 21 anos, sem raça definida, com peso médio de 500 kg. Os animais estavam clinicamente hígidos e com perfil hematológico adequado.

3.1.2 Identificação dos animais

Os animais selecionados foram identificados pelo corte da crina, onde somente é deixado um tufo de pelos de aproximadamente 3 cm de altura por 2 cm de comprimento próximo à nuca, estando o restante da crina devidamente aparado. Eles também foram identificados por números marcados a ferro quente no casco anterior esquerdo, recebendo as seguintes numerações: 26, 88, 96, 98, 175, 176, 184, 257, 261, 263, 266, 267, 268, 269, 273, 274, 277, 278, 280, 281, 283, 285, 286, 288, 289, 290, 291, 295, 296, 297, 299, 301, 303, 305, 307, 314, 318, 326, 332, 335. Possuem ainda uma marcação a fogo – EB regulamentar do Exército Brasileiro - na região tibial direita.

3.2 PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE PLASMA HIPERIMUNE

No início de cada ciclo de produção é recebido do Instituto Butantan o Protocolo de Envio de Antígeno e o Boletim de Imunização onde estão descritos os animais a serem inoculados, os dias de inoculações / sangrias e as doses a serem utilizadas nas imunizações, conforme o Quadro 2. Na produção do plasma hiperimune equino do IBEx os equinos são imunizados com antígenos recebidos do Instituto Butantan.

O antígeno para o gênero *Bothrops* deve incluir: 50% de veneno de *B. jararaca* e 12,5% de cada um dos venenos de *B. moojeni*, *B. jararacussu*, *B. alternatus* e *B. neuwiedi* (BRASIL, 1996).

Quadro 2 - Protocolo de Produção de Plasma Hiperimune do IBEx

Dia	Procedimento
01	1ª Inoculação
12	2ª Inoculação
22	Sangria Exploratória
25	1ª Sangria de Produção
27	2ª Sangria de Produção e Plasmaferese
29	3ª Sangria de Produção e Plasmaferese

fonte: Elaborado pelo autor, 2013

3.2.1 Preparo e inoculação do antígeno

Para a produção de plasma hiperimune equino antibotrópico foi preparado um inoculo contendo 5,0 mg de veneno botrópico diluído em uma emulsão de solução salina 0,85%, solução marcol montanide e solução salina tween 2% (chamada Emulsão Múltipla Incompleta – EMI). Esta emulsão, utilizada sempre no primeiro dia da cada ciclo de imunização, foi inoculada em três pontos do dorso do animal, sendo 2,0 mL por ponto, por via subcutânea. O outro inoculo foi preparado contendo 3,5 mg de veneno botrópico diluído em solução PBS (Phosphate Buffered Solution) pH

7,2 (que é uma solução tampão), sendo inoculado em três pontos do dorso do animal, 2,0 mL por ponto, pela via subcutânea, no 12º dia do ciclo.

O local de aplicação foi previamente lavado com água e solução de digluconato de clorexidina a 2% para uma higiene inicial; posteriormente a operação se repetiu sem a retirada da solução de digluconato de clorexidina a 2% para que se promovesse a tricotomia; após, a mesma área foi lavada com água; após a tricotomia e imediatamente antes da inoculação realizou-se a antissepsia do local com auxílio de algodão embebido em álcool 70°.

3.2.2 Sangrias

No 22º dia do ciclo foi feita uma Sangria Exploratória para verificar a resposta de anticorpos no soro de cada animal produtor. Se a titulação de anticorpos do soro sanguíneo foi encontrada ideal, isto é, foi atingida a potência mínima, foram feitas as Sangrias de Produção no 25º, 27º e 29º dias do ciclo.

Antes das sangrias de produção foram realizados exame clínico, hematócrito e pesagem dos animais. Todas as sangrias foram realizadas por punção da veia jugular precedidas de tricotomia e antissepsia da calha da jugular no seu terço crânio-médial e garroteamento da calha da jugular no seu terço médio-distal.

A colheita do sangue foi realizada em bolsa dupla identificada (com a tropa, número do animal e data da sangria), em circuito fechado; promoveu-se a colheita direto para seu interior, livre de contaminação; foram coletados 6 litros de sangue de cada animal. A bolsa foi lacrada com seladora e armazenada pendurada em cabides na câmara fria. As bolsas permaneceram no interior da câmara fria por 48 horas a fim de promover uma boa decantação das hemácias a uma temperatura entre 4º e 8º graus. Após esse tempo, as bolsas foram colocadas no extrator de plasma para que o mesmo fosse transferido para a bolsa definitiva. A bolsa foi colocada novamente na câmara fria em caixas de acondicionamento para posterior envio ao Instituto Butantan.

Os elementos figurados do plasma foram ressuspensos em 2 litros de solução de cloreto de sódio 0,9% e reinfundidos no respectivo equino do qual foi coletado.

Isso permite devolver as hemácias ao cavalo, num processo denominado plasmaferese, o qual possibilita uma recuperação mais rápida do animal.

3.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS DE SANGUE PARA A PROVA DE POTÊNCIA

O momento da colheita se deu no 22^o dia do ciclo, na etapa denominada Sangria Exploratória.

Após antissepsia local, foram coletadas amostras sanguíneas de cada animal por punção na veia jugular externa utilizando-se agulha 25 mm x 8 mm, em tubo de vidro siliconizado para coleta a vácuo, com gel ativador, com capacidade de 10 mL e sem anticoagulante. Foram coletados 2 tubos por animal.

Após a coleta, os tubos foram identificados com o número do animal correspondente e colocados em estantes dentro de caixa de isopor com gelo e enviados para a Seção de Laboratório da Divisão Veterinária do IBEx.

3.4 PROVA DE POTÊNCIA

3.4.1 Preparo da amostra

A amostra testada corresponde a um pool de todos os soros sanguíneos dos animais inoculados.

Os tubos de dosagem foram numerados de 1 a 5.

Considerando-se que seria inoculado o volume de 0,5 mL da amostra por camundongo, num total de 6 camundongos, foi calculado o volume de soro da amostra inicial (Tubo 1), onde a potência seria 5,0 mg / mL.

Foram feitas 4 diluições sucessivas da amostra em prova com solução fisiológica (Tubos 2 a 5) utilizando um fator de diluição constante (1,2) de maneira que o volume final foi idêntico em todos os tubos.

A cada tubo foi adicionado volume constante da solução de veneno referência, de modo que cada volume inoculado por animal contenha 5 DL₅₀.

As misturas foram homogeneizadas e incubadas a 37° C, por 30 minutos.

3.4.2 Preparo dos animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) albinos, linhagem Swiss webster, de mesmo sexo e peso entre 18 e 22 gramas.

Os animais foram colocados em caixas previamente identificadas, em grupos de 6 animais por caixa para cada diluição.

3.4.3 Inoculação e observação dos animais

Foi inoculado, por via intraperitoneal, um volume constante de 0,5 mL de cada diluição por camundongo, utilizando-se seringas de 3 mL e agulha 13 mm x 3 mm.

Os dados dos animais (sobreviventes / número de animais inoculados) foram registrados diariamente no protocolo, durante 48 horas.

3.4.4 Cálculo da DE₅₀ e da potência

A DE₅₀ foi calculada usando-se um programa de probito fornecido pelo IB.

Foram fornecidos os seguintes dados ao programa: data da análise estatística, lote do produto, o valor da DL₅₀, o número de diluições utilizadas, a diluição utilizada por animal, o número de animais sobreviventes e o número de animais inoculados;

O valor da potência do soro foi determinado pelo programa eletrônico conforme a fórmula:

$$P = \frac{(TV-1) \times DL_{50}}{DE_{50}}$$

Onde:

P = potência

TV = número de DL50 utilizadas na prova por camundongo

DL₅₀ = DL₅₀ do veneno

DE₅₀ = DE₅₀ do soro

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos da colheita de soro sanguíneo de 40 equinos, sem raça definida, criados na Fazenda Modelo Gericinó, pertencentes ao Instituto de Biologia do Exército, no Rio de Janeiro – RJ, para prova de potência do plasma hiperimune antibotrópico, durante os ciclos de produção, estão apresentados em 4 quadros.

O Quadro 3 se refere ao 1º ciclo de produção, que ocorreu entre fevereiro e março de 2012. O Quadro 4 se refere ao 2º ciclo de produção, que ocorreu entre abril e maio de 2012. O Quadro 5 se refere ao 3º ciclo de produção, que ocorreu entre julho e agosto de 2012. O Quadro 6 se refere ao 4º ciclo de produção, que ocorreu entre setembro e outubro de 2012.

Quadro 3 - Resultado da Prova de Potência do Plasma Hiperimune Antibotrópico do 1º Ciclo de Produção de 2012

DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DE ANTIVENENO EM CAMUNDONGOS						
TIPO DE SORO BOTRÓPICO		EQUINO POOL		FATOR DE DILUIÇÃO 1,2		
DL50 63,8 mg/mL		SOLUÇÃO DO VENENO 1 mg/mL		VIA DE ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONIAL		
NÚMERO CAIXA	DOSE de SORO	VOLUME de SORO (µL)	VOLUME de VENENO (µL)	ANIMAIS INOC./SOBREV.		POTENCIA mg/mL
				24 h	48 h	
1	51,04	408,3	2.552,0	6/6	6/6	5,0
2	42,54	340,3	2.552,0	6/5	6/5	6,0
3	35,5	283,6	2.552,0	6/3	6/3	7,2
4	29,54	236,3	2.552,0	6/2	6/2	8,64
5	24,61	196,9	2.552,0	6/0	6/0	10,37
Salina q.s.p. 4 mL						
Data do Teste: 07 de março de 2012				Potência = 7,43 mg/mL		

fonte: Elaborado pelo autor, 2013

Quadro 4 - Resultado da Prova de Potência do Plasma Hiperimune Antibotrópico do 2º Ciclo de Produção de 2012

DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DE ANTIVENENO EM CAMUNDONGOS						
TIPO DE SORO BOTRÓPICO		EQUINO POOL		FATOR DE DILUIÇÃO 1,2		
DL50 63,8 mg/mL		SOLUÇÃO DO VENENO 1 mg/mL		VIA DE ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONIAL		
NÚMERO CAIXA	DOSE de SORO	VOLUME de SORO (µL)	VOLUME de VENENO (µL)	ANIMAIS INOC./SOBREV.		POTENCIA mg/mL
				24 h	48 h	
1	51,04	408,3	2.552,0	6/6	6/6	5,0
2	42,54	340,3	2.552,0	6/4	6/4	6,0
3	35,5	283,6	2.552,0	6/3	6/3	7,2
4	29,54	236,3	2.552,0	6/2	6/2	8,64
5	24,61	196,9	2.552,0	6/0	6/0	10,37
Salina q.s.p. 4 mL						
Data do Teste: 16 de maio de 2012				Potência = 7,20 mg/mL		

fonte: Elaborado pelo autor, 2013

Quadro 5 - Resultado da Prova de Potência do Plasma Hiperimune Antibotrópico do 3º Ciclo de Produção de 2012

DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DE ANTIVENENO EM CAMUNDONGOS						
TIPO DE SORO BOTRÓPICO		EQUINO POOL		FATOR DE DILUIÇÃO 1,2		
DL50 63,8 mg/mL		SOLUÇÃO DO VENENO 1 mg/mL		VIA DE ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONIAL		
NÚMERO CAIXA	DOSE de SORO	VOLUME de SORO (µL)	VOLUME de VENENO (µL)	ANIMAIS INOC./SOBREV.		POTENCIA mg/mL
				24 h	48 h	
1	51,04	408,3	2.552,0	6/6	6/6	5,0
2	42,54	340,3	2.552,0	6/5	6/5	6,0
3	35,5	283,6	2.552,0	6/3	6/3	7,2
4	29,54	236,3	2.552,0	6/1	6/1	8,64
5	24,61	196,9	2.552,0	6/0	6/0	10,37
Salina q.s.p. 4 mL						
Data do Teste: 06 de agosto de 2012				Potência = 7,19 mg/mL		

fonte: Elaborado pelo autor, 2013

Quadro 6 - Resultado da Prova de Potência do Plasma Hiperimune Antibotrópico do 4º Ciclo de Produção de 2012

DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DE ANTIVENENO EM CAMUNDONGOS						
TIPO DE SORO BOTRÓPICO		EQUINO POOL		FATOR DE DILUIÇÃO 1,2		
DL50 63,8 mg/mL		SOLUÇÃO DO VENENO 1 mg/mL		VIA DE ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONIAL		
NÚMERO CAIXA	DOSE de SORO	VOLUME de SORO (µL)	VOLUME de VENENO (µL)	ANIMAIS INOC./SOBREV.		POTENCIA mg/mL
				24 h	48 h	
1	51,04	408,3	2.552,0	6/6	6/6	5,0
2	42,54	340,3	2.552,0	6/5	6/5	6,0
3	35,5	283,6	2.552,0	6/3	6/3	7,2
4	29,54	236,3	2.552,0	6/2	6/2	8,64
5	24,61	196,9	2.552,0	6/0	6/0	10,37
Salina q.s.p. 4 mL						
Data do Teste: 11 de outubro de 2012				Potência = 7,43 mg/mL		

fonte: Elaborado pelo autor, 2013

5 DISCUSSÃO

Envenenamentos e mortes causados por acidentes ofídicos são um problema de saúde pública particularmente importante em áreas tropicais. Trabalhadores agrícolas e crianças são os grupos mais afetados. A avaliação epidemiológica da verdadeira incidência de mortalidade e morbidade de acidentes ofídicos tem sido dificultada por sub-notificações. Acidente ofídico é considerado uma doença tropical negligenciada (WHO, 2010).

No final do século XIX, Von Behring e Kitasato relataram as propriedades antitóxicas do soro de animais imunizados contra a toxina diftérica e tetânica e sugeriram a utilização de antisoros para o tratamento dessas doenças. Em 1894 ficou comprovado o sucesso da “terapia do soro”. No mesmo ano, Phisalix e Bertrand e Calmette apresentaram suas observações sobre as propriedades antitóxicas do soro de coelhos e cobaias imunizadas contra o veneno de cobras e víboras. Albert Calmette envolveu-se ativamente em provar a eficácia da soroterapia antiveneno no tratamento de humanos, o que foi conseguido em 1896. Historicamente, os pioneiros Calmette, Vital Brazil e outros, utilizaram soro separado do sangue de cavalos hiperimunizados para a preparação de soro antiofídico e soroterapia. (WHO, 2010).

Vital Brazil prossegue com suas pesquisas e, um a um, produz soros contra o veneno de todas as serpentes encontradas no Brasil, ajudando a fundar o Instituto Butantan e o Instituto Vital Brazil (OLIVEIRA, 2004b).

No início da década de 1980 foi demonstrado a obsolescência do parque produtor nacional de imunobiológicos e a má qualidade de diversos produtos, o que desencadeou grave crise de abastecimento de algumas vacinas e soros, principalmente os antiofídicos. Com isso foi criado o Programa de Auto-Suficiência Nacional em Imunobiológicos (PASNI) que tinha como principal objetivo o fortalecimento do parque produtor nacional de imunobiológicos, criando uma política de produção e de controle da qualidade. Desde aquela época, os soros são produzidos em vários laboratórios brasileiros; entre eles está o Instituto de Biologia do Exército, produtor de plasma. O país conta também com um laboratório de controle da qualidade: o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (BRASIL, 2003).

Dentro das Normas de Produção e Controle da Qualidade dos Soros Antiofídicos está o controle das operações de produção, que determina o controle do plasma individual e do plasma a granel através da prova de atividade (ou de potência). Nesta prova de atividade, em cada plasma individual e numa amostra do plasma a granel, determina-se a capacidade neutralizante do efeito letal do veneno de referência correspondente, utilizando o método de soroneutralização em camundongos albinos suíços ou métodos *in vitro* validados. O título neutralizante mínimo para o soro antiofídico é de 5 mg/mL (BRASIL, 1996).

Segundo a Farmacopéia Brasileira (2010), o soro antiofídico contém em cada mililitro imunoglobulinas suficientes para neutralizar 5 mg de veneno de referência de *B. jararaca*. O título da potência é expresso em miligramas de veneno neutralizados por 1 mL da amostra. Poderá haver um coeficiente de variação igual a 10% em virtude da variação inerente aos testes com animais de laboratório. Deste modo a potência mínima poderá variar até 4,5 mg/mL.

No 1º ciclo e no 4º ciclo a potência do plasma hiperimune antiofídico produzido no IBEx foi de 7,43 mg/mL, ou seja, 48,6% acima da potência mínima exigida pela legislação. Considerando-se a variação de 10% esse índice passa a ser de 54% acima da potência mínima.

No 2º ciclo a potência do plasma hiperimune antiofídico produzido no IBEx foi de 7,20 mg/mL, ou seja, 44% acima da potência mínima exigida pela legislação. Considerando-se a variação de 10% esse índice passa a ser de 48,89% acima da potência mínima.

No 3º ciclo a potência do plasma hiperimune antiofídico produzido no IBEx foi de 7,19 mg/mL, ou seja, 43,8% acima da potência mínima exigida pela legislação. Considerando-se a variação de 10% esse índice passa a ser de 48,67% acima da potência mínima (Quadro 7).

Quadro 7 – Comparação entre a potência do plasma hiperimune antibotrópico produzido no IBEx nos ciclos de 2012 e a potência mínima exigida pela legislação

Ciclo de produção	Potência do plasma	Valor acima da potência mínima	Valor acima da variação de 10%
1º	7,43 mg/ml	48,6%	54%
2º	7,20 mg/ml	44%	48,89%
3º	7,19mg/ml	43,8%	48,67%
4º	7,43 mg/ml	48,6%	54%

Elaborado pelo autor, 2013

Nos 4 ciclos de produção de 2012 de plasma hiperimune equino antibotrópico do Instituto de Biologia do Exército, a potência do mesmo esteve dentro do que a legislação determina.

Houve uma diminuição gradativa na potência do plasma hiperimune equino antibotrópico ao longo do ano, com exceção do 4º ciclo quando a potência voltou ao nível do 1º ciclo. Resultado semelhante foi observado por Freitas (1997).

6 CONCLUSÃO

A pesquisa desenvolvida para avaliar a qualidade do plasma hiperimune equino antibotrópico produzido no Instituto de Biologia do Exército no ano de 2012 permitiu as seguintes conclusões:

1- Após a realização da prova de potência do plasma hiperimune equino antibotrópico de cada ciclo de produção de 2012, foi determinado a potência deste plasma:

- No 1º ciclo de produção, a potência do plasma hiperimune equino antibotrópico foi de 7,43 mg/mL;
- No 2º ciclo de produção, a potência do plasma hiperimune equino antibotrópico foi de 7,20 mg/mL;
- No 3º ciclo de produção, a potência do plasma hiperimune equino antibotrópico foi de 7,19 mg/mL;
- No 4º ciclo de produção, a potência do plasma hiperimune equino antibotrópico foi de 7,43 mg/mL.

2- Em todos os ciclos a potência do plasma hiperimune equino antibotrópico ficou sempre acima do limite mínimo determinado pelas Normas de Produção e Controle de Qualidade dos Soros Antiofídicos, Antitóxicos e Anti-Rábico (1996) e pela Farmacopéia Brasileira (2010).

Concluiu-se que a potência do plasma hiperimune equino antibotrópico produzido no Instituto de Biologia do Exército no ano de 2012 está dentro do padrão estabelecido pela legislação, sendo uma das garantias da sua qualidade.

REFERÊNCIAS

- BÉRNILS, R. S. e H. C. COSTA (org.). 2012. Répteis brasileiros: Lista de espécies. Versão 2012.1. Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acesso em: 10 nov 2012.
- BORGES, R. C. **Serpentes peçonhentas brasileiras: manual de identificação, prevenção e procedimentos em casos de acidentes**. São Paulo: Atheneu, 2001.
- BRASIL. Fundação Nacional da Saúde, Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 174, de 11 de novembro de 1996. Aprova as Normas de Produção e Controle de Qualidade dos Soros Antiofídicos, Antitóxicos e Anti-Rábico. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 nov. 1996. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/saudelegis/svs/1/1996/prt0174_11_11_1996.html>. Acesso em: 22 dez. 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Imunizações 30 anos**. Brasília, 2003.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Acidentes por animais peçonhentos. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, Brasília, caderno 14, p. 1-24, 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_aap.pdf> Acesso em: 14 abr. 2012.
- CARDOSO, D. F.; YAMAGUCHI, I. K.; SILVA, A. M. M. Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. In: CARDOSO, J. L. C. et al. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 367 – 379.
- CARDOSO, J. L. C.; WEN, F. H. Introdução ao ofidismo. In: CARDOSO, J. L. C. et al. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 3 – 5.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 5 ed. Brasília: ANVISA, 2010. 2 v.
- FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente botrópico. In: CARDOSO, J. L. C. et al. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 72 - 86.
- FREITAS, C. F. **Plasmaferese na Produção de Soros Hiperimunes Anti-Crotalus durissus terrificus (Laurenti, 1768) em Equinos**. 1997.52f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.
- GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Efeitos locais no envenenamento ofídico na América Latina. In: CARDOSO, J. L. C. et al. **Animais peçonhentos no Brasil:**

biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 324 - 333

GUTIERREZ, J. M. Snakebite envenoming: a public health perspective. In: MADDOCK, J. **Public Health – Methodology, Environmental and Systems Issues.** Croatia: Ed. InTech, 2012. p 131-162.

HIGASHI, H. G.; RAW, I.; MERCADANTE, O. A. Desenvolvimento e produção de vacinas e soros no Instituto Butantan. Parte V, cap. 17. In: BUSS, P. M.; TEMPORÃO, J. G.; CARVALHEIRO, J. R. (Org.). **Vacinas, soros e imunizações no Brasil.** Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2005.

INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO. **Divisão Veterinária.** Disponível em: <<http://www.ibex.eb.mil.br/index.php>>. Acesso em: 17 jan. 2013.

LUCAS, E. P. R. **Estudo interlaboratorial para o estabelecimento do veneno botrópico e do soro antibotrópico de referência nacional.** 2009. 85 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. C. et al. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo: Sarvier, 2003. p. 33 - 61.

MIRANDA, D. P.; HENRIQUES, C.M.P. Imunobiológicos e vigilância sanitária. Parte II, cap. 6. In: BUSS, P. M.; TEMPORÃO, J. G.; CARVALHEIRO, J. R. (Org.). **Vacinas, soros e imunizações no Brasil.** Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2005.

OLIVEIRA, M. M. V. Homenagem a Vital Brazil. In: **CADERNOS técnicos de veterinária e zootecnia,** Belo Horizonte, n. 44, p. 7- 10, out. 2004a.

OLIVEIRA, M. M. V. Serpentes venenosas. In: **CADERNOS técnicos de veterinária e zootecnia,** Belo Horizonte, n. 44, p. 11 - 58, out. 2004b.

QUEIROZ, W. J. **O processo produtivo do soro antiofídico: da crise à superação?** 2005. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) – Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2005.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVO DE NOTIFICAÇÃO. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. **Acidentes por animais peçonhentos.** Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em: 16 nov. 2012.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO FARMACOLÓGICAS. **Registros de Intoxicações.** Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=379>. Acesso em: 26 jan. 2013.

TEMPORÃO, J. G.; NASCIMENTO, M. V. L.; MAIA, M. L. S. Programa Nacional de Imunizações (PNI): história, avaliação e perspectivas. Parte II, cap. 5. In: BUSS, P.

M.; TEMPORÃO, J. G.; CARVALHEIRO, J. R. (Org.). **Vacinas, soros e imunizações no Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2005.

WEN, F. H. Soroterapia. In: CARDOSO, J. L. C. et al. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 380 - 389.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the production control and regulation of snake antivenom immunoglobulins**. Suíça, 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms>> Acesso em: 10 nov. 2012.