

Testes de potência alternativos para controle da qualidade de imunobiológicos: revisão crítica de abordagens de validação

Alternative potency tests for quality control of immunobiologicals: a critical review of the validation approach

RESUMO

Wildeberg Cal Moreira^{1*} 

Nathalia de Souza Machado¹ 

Jéssica Ferreira de Souza
Freitas¹ 

Antônio Eugênio Castro Cardoso
de Almeida¹ 

Wlamir Correa de Moura¹ 

Introdução: Os ensaios de potência *in vivo* utilizados no controle da qualidade de imunobiológicos requerem o uso de muitos animais, e além da baixa reprodutibilidade, causam dor e sofrimento significativos. Nas últimas décadas, muitos estudos foram desenvolvidos para validar métodos alternativos para o controle da qualidade e liberação de lotes de produtos como vacinas e outros imunobiológicos, especialmente para os testes de potência. **Objetivo:** Discutir os estudos de validação sobre métodos alternativos para substituir ensaios de potência *in vivo*, a abordagem estatística utilizada e propor a harmonização da terminologia e o desenho para os estudos de validação de métodos alternativos de potência. **Método:** Uma pesquisa de revisão foi realizada em bases de dados científicos para compilar os produtos e dados dos procedimentos de validação, verificando sua inclusão nas farmacopeias. **Resultados:** Quatro ensaios foram incorporados em farmacopeias. As abordagens estatísticas incluíram principalmente a avaliação da regressão, ANOVA e teste de Qui-quadrado. **Conclusões:** É um desafio realizar estudos de validação adequados que sejam amplamente aceitos pelas autoridades reguladoras, especialmente onde os centros de validação ainda não foram estabelecidos. Um indicador claro dessa dificuldade foi o baixo número de métodos para produtos biológicos incorporados nas diretrizes.

PALAVRAS-CHAVE: Métodos Alternativos; Imunobiológicos; Teste de Potência; Abordagem de Validação

ABSTRACT

Introduction: In addition to low reproducibility, *in vivo* potency tests used in the quality control of immunobiological products require too many animals, causing them significant pain and suffering. In the last decades, many studies have been conducted to validate alternative methods for quality control and batch release of products such as vaccines and other immunobiologicals, especially for potency tests. **Objective:** To discuss validation studies on alternative methods proposed for replacing the *in vivo* potency tests and the used statistical approach, as well as to propose harmonization of terminology and to design validation studies for alternative potency methods. **Method:** A review of scientific databases was carried out to compile the products, data on the validation procedures and to verify their inclusion in the pharmacopeias. **Results:** Four trials were incorporated into the pharmacopeias. Statistical approaches included mainly regression assessment, ANOVA and Chi-square test. **Conclusions:** It is a challenge to conduct appropriate validation studies that are widely accepted by regulatory authorities, especially where validation centers have not yet been established. A clear indicator of this difficulty was the low number of methods for biological products incorporated into the guidelines.

¹ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: wildeberg.moreira@incqs.fiocruz.br



INTRODUÇÃO

Diversos testes exigidos pelas agências reguladoras e diretrizes para garantir a eficácia e a segurança de produtos requerem o uso de um grande número de animais, causando dor e sofrimento significativos^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13}. Estima-se que cerca de 10 milhões de animais de laboratório sejam utilizados na indústria e no controle da qualidade de produtos biológicos anualmente em todo o mundo, dos quais 80% são necessários para testar a segurança e a potência em liberação de lotes.

Na abordagem tradicional de liberação de lotes, a base geral para o teste da qualidade fundamenta-se em demonstrar a consistência da produção utilizando métodos analíticos. No entanto, originalmente, um paradigma diferente era aplicado às vacinas, produtos imunobiológicos complexos contendo antígenos, adjuvantes, excipientes e conservantes, e os lotes eram considerados produtos únicos. Por esse motivo, os reguladores exigiam testes extensivos de controle da qualidade de cada lote de vacina licenciada, para que a segurança e a potência fossem testadas, lote a lote, geralmente em animais¹⁵.

Ao contrário das vacinas com agentes viáveis que são avaliadas pela titulação *in vitro*, são necessários ensaios de potência *in vivo* para cada lote de vacinas inativadas. Geralmente, os testes de potência clássicos de vacinas inativadas são baseados na vacinação seguida de um desafio letal contra um agente ou toxina-padrão^{16,17,18,19}. Esses testes são bem conhecidos pelo grande número de animais necessários, longa duração, alta variabilidade e problemas para alcançar os critérios de aceitação do ensaio^{20,21}.

A abordagem de consistência de produção proposta como um novo conceito de controle da qualidade para vacinas é considerada uma mudança de paradigma¹⁴. Nessa abordagem, o controle da qualidade consiste no uso de um conjunto de parâmetros para determinar o perfil do produto, monitorado durante a produção, garantindo que cada lote seja semelhante à vacina específica do fabricante, com eficácia clínica e segurança comprovadas²².

Nas últimas décadas, muitos estudos foram desenhados para validar métodos alternativos aplicados ao controle e liberação de lotes de produtos biológicos, principalmente testes de potência. Apesar da possibilidade de usar ensaios alternativos, os ensaios de vacinação-desafio (VD) ainda são amplamente utilizados¹². A literatura acadêmica e os compêndios propõem diversas alternativas de ensaio *in vitro* para análise da eficácia e segurança de imunobiológicos que requerem validação analítica. Entre suas vantagens, estão a duração do teste, melhor reprodutibilidade, testes de baixo custo em animais e o fato de estarem sujeitos à validação metodológica, o que tem um impacto positivo na rotina de controle da qualidade.

Validação de métodos alternativos

A validação é um estudo em que a confiabilidade e a relevância de um método ou processo são estabelecidas para uma finalidade específica^{1,9,23,24}. Ensaios de potência de vacina são geralmente baseados em: 1) tipo de vacina testada e 2) detalhes específicos do procedimento analítico, no qual a potência pode ser expressa como teor de antígeno ou, mais comumente, como atividade biológica. Os métodos

disponíveis incluem ensaios baseados em animais, culturas de células, bioquímica e ligação ao receptor-ligante em alguns casos^{14,25}.

Abordagens semelhantes foram aplicadas às vacinas disponíveis no mercado, principalmente as purificadas e dentro do escopo das diretrizes Q6B²⁶, enquanto que as vacinas consistindo em proteínas ou peptídeos bem caracterizados são explicitamente incluídas nas diretrizes Q5C²⁷ do Conselho Internacional de Harmonização (ICH).

Boas práticas de fabricação (BPF) e validação

O produtor deve demonstrar a segurança e a eficácia do produto antes que agências reguladoras, como a Agência de Medicamentos e Alimentos dos EUA (FDA) e a Agência Europeia de Medicamentos (EMA), aprovem o novo medicamento²⁸. Além disso, regulamentos de fabricação, como as Boas Práticas de Fabricação Atuais dos EUA (cGMP), que introduziram os requisitos de validação de processos nos anos 80, também estipulam a adoção de padrões modernos no desenho, monitoramento e controle de processos de fabricação, bem como instalações que garantam um fornecimento consistente de produtos de alta qualidade²⁹.

A FDA revisou a análise de riscos, a adequação e as inspeções de políticas, para que as análises químicas analíticas, de fabricação e controle (CMC) se concentrem nas questões de risco. A iniciativa foi guiada pela visão de uma indústria farmacêutica mais eficiente, ágil e flexível, capaz de produzir medicamentos de alta qualidade sem exageros regulatórios³⁰. As regras mais evidentes resultantes dessas alterações incluíram a publicação de documentos do Guia ICH (ICH Q8 [R2], 8, 9 e 10) relacionados ao desenvolvimento farmacêutico, qualidade do gerenciamento de riscos e do sistema farmacêutico^{31,32,33}. Outros guias estabelecem os requisitos para verificar a conformidade com as BPF e, desde que validados, podem adotar ações alternativas. Os estudos de validação são uma parte essencial das BPF e devem ser realizados de acordo com protocolos aprovados predefinidos³⁴.

Os métodos validados para reduzir, refinar ou substituir o uso de animais (3Rs) geralmente envolvem aqueles validados por testes colaborativos realizados pelo fabricante para um determinado produto ou validados e publicados por outro laboratório. Esses testes são realizados sob a égide de organizações com esse objetivo, ao passo que os métodos alternativos para testes de consistência devem ser aceitos pelo laboratório oficial de controle e pelos fabricantes^{8,35,36,37}. O processo de validação é geralmente aceito para facilitar e/ou acelerar a aceitação internacional (regulatória) de métodos/abordagens alternativas de teste⁹, uma vez que informações empíricas são geradas e/ou avaliadas quanto à confiabilidade e relevância de um método/abordagem de teste em condições padronizadas e controladas.

Principais organizações internacionais envolvidas

As principais instituições envolvidas nos estudos de validação, seja emitindo diretrizes de validação ou coordenando estudos, são: Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (ICH), Laboratório



de Referência da União Europeia para Alternativas a Ensaios Animais - Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos (EURL-ECVAM), Direção Europeia da Qualidade dos Medicamentos e Cuidados de Saúde (EDQM), Comitê de Coordenação Interagências para a Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM, EUA), Centro Japonês de Validação de Métodos Alternativos (JaCVAM), Centro Johns Hopkins de Alternativas para Testes em Animais (CAAT, EUA), Organização Mundial de Saúde (OMS) e, no Brasil, Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM) e o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

A EDQM, o JaCVAM, o BraCVAM e a Rede Nacional de Métodos Alternativos ao uso de animais (RENAMA) realizam estudos para incluir os métodos validados com sucesso em diretrizes e monografias da farmacopeia. Enquanto isso, outros estudos visam alcançar uma maior harmonização em todo o mundo para garantir o desenvolvimento e o registro de medicamentos seguros, eficazes e de alta qualidade, embora não estejam diretamente envolvidos no processo de validação, como o ICH.

Ademais, instituições como a Parceria Europeia para Abordagens Alternativas ao Teste em Animais (EPAA, UE), o Fundo para Substituição de Animais em Experiências Médicas (FRAME), a Fundação Doerenkamp-Zbinden para Pesquisa Sem Animais (GM), a Plataforma de Consenso Europeu para Alternativas - ECOPA e o Centro Holandês de Conhecimento sobre Alternativas ao Uso de Animais (NKCA) são dedicados ao financiamento de pesquisas e à adoção de métodos alternativos.

Procedimento de validação

Em 1998, o workshop do ECVAM/EPAA publicou um relatório que apresentava os aspectos básicos da validação de métodos alternativos de testes de potência de vacina. Após duas décadas, a EMA publicou recentemente uma diretriz útil para a implementação dos 3Rs ensaios *in vitro* validados³⁹ e a EDQM incluiu um capítulo na Farmacopeia Europeia (Ph. Eur.). A Comissão da Ph. Eur. acrescentou um quarto “R”, “Removal” (Remoção) como estratégia para acabar com o uso desnecessário de animais, eliminando a necessidade de realização regular de testes em animais que não são mais relevantes e que podem ser excluídos sem necessidade de substituição por outro teste⁴⁰ após pesquisa científica.

A validação deve ser considerada ao desenvolver ou modificar metodologias validadas. Vários estudos na literatura relatam métodos de validação para determinação de potência^{1-8,10-13,22,35-38,41-54}, descrevendo as abordagens para desenhar a validação, critérios de aceitação, análise e interpretação de dados e até mesmo monitoramento de desempenho através do controle da qualidade^{9,38,55,56,57,58,59,60,61,62}. A ICH Q2 (R1) é considerada a principal referência para recomendações e definições de características de validação de procedimentos analíticos para produtos farmacêuticos de uso humano. Normalmente, são avaliadas exatidão (veracidade no Vocabulário Internacional de Metrologia - IVM), precisão (repetibilidade e precisão intermediária), especificidade, limites de detecção e quantificação, linearidade e intervalo. Além disso, o método deve ter sido qualificado²⁵ antes de realizar um estudo de validação multicêntrica.

Os estudos colaborativos geralmente seguem uma abordagem em etapas (*stepwise*). O número e o detalhamento das etapas dependem de cada caso, mas geralmente incluem etapas de pré-validação, como prova de conceito e transferibilidade, incluindo lógica e desenvolvimento de protocolo e otimização para obter especificidade, sensibilidade, repetibilidade e reprodutibilidade suficientes. O método é transferido para pelo menos um laboratório adicional⁶³ após estabelecer a prova de conceito.

O método é considerado validado após a determinação de sua confiabilidade e relevância para uma finalidade específica^{38,39,64}. No desenho do estudo, os procedimentos dos ensaios candidatos são descritos para permitir as condições necessárias para a reprodutibilidade e a obtenção de resultados dentro dos critérios de aceitação propostos⁶⁰.

O estágio de estudo colaborativo em larga escala envolve muitos laboratórios e inclui uma gama de produtos. Nesta fase, devem ser definidos ou, pelo menos, claramente propostos, o protocolo, os reagentes, os controles e os materiais de referência⁶³.

Esta revisão teve como objetivo discutir estudos de validação publicados e sua abordagem estatística para métodos alternativos de estimativa de potência, aplicados à liberação de lote de produtos biológicos.

MÉTODO

Uma pesquisa de revisão sobre estudos de validação para testes de potência de imunobiológicos foi realizada nas seguintes bases de dados científicos: Pubmed, Scientific Electronic Library Online (SciELO) e Biblioteca Virtual em Saúde, incluindo Medline, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) e Cochrane Library, até novembro de 2018, utilizando as palavras-chave “métodos alternativos” e “validação” ou “abordagem de validação” (“alternative methods” and “validation” or “validation approach”). Foram incluídos neste estudo os artigos que descrevem a abordagem de validação para testes de potência alternativos. Os demais artigos foram excluídos. Após encontrar os artigos científicos e as diretrizes de validação, foi criada uma planilha do MS-Excel® para a compilação dos produtos e dados do procedimento de validação, verificando sua inclusão nas farmacopeias.

RESULTADOS

Ensaio de potência

Geralmente, a potência é definida como a capacidade de um produto gerar uma atividade biológica específica que pode ser quantificada²⁶. Portanto, os testes de potência devem ser projetados para medir a atividade biológica relevante ou uma propriedade específica do produto, incluindo o uso de um padrão de referência para comparar e demonstrar consistência e estabilidade de lote para lote, para fins de liberação desses lotes⁶⁵. Dos 2.909 artigos encontrados, os 22 selecionados descrevem uma abordagem de validação para testes de potência alternativos que substituíram, refinaram ou reduziram o uso de animais de laboratório no controle da qualidade de produtos imunobiológicos. Os demais artigos foram excluídos do estudo. Vários modelos foram desenvolvidos como possíveis métodos alternativos (Tabela 1).



Tabela 1. Estudos avaliados de acordo com produto, ensaio, abordagem, método alternativo e parâmetros de validação.

Artigos científicos	Produto	Ensaio			Validação		
		Tradicional	Candidato	Abordagem	Parâmetros	Análise estatística	Aspecto relevante
Hendriksen et al., 1988 ¹	NA	VD	ToBI		Confiabilidade Relevância Sensibilidade Reprodutibilidade	Correlação linear	Designa de reprodutibilidade o que é a repetibilidade atual.
Sigoillot-Claude et al., 2015 ⁵⁴	Vacina antirrábica veterinária monovalente ou combinada	VD	ELISA	Validação de produto específico	Confiabilidade	Linearidade (testes de Cochran e Bartlett) Regressão linear	O monitoramento durante todas as fases do ciclo do produto. A validação preliminar deste novo TRFIA para vacinas contra raiva e o método demonstraram resultados satisfatórios.
Lin et al., 2017 ⁴⁶	Vacina antirrábica	VD	TRFIA		Sensibilidade Precisão Recuperação Linearidade Confiabilidade	Correlação	
Hendriksen et al., 1991 ²	Vacina de toxoide tetânico	VD	ToBI		NI	Correlação Teste qui-quadrado	É necessária validação adicional.
van der Ark et al., 1994 ³	Vacina de célula inteira contra coqueluche	VD	ELISA		Reprodutibilidade	Linhas paralelas Teste qui-quadrado ANOVA Correlação	Chama de reprodutibilidade o que é a repetibilidade atual. Substituto promissor, exigindo estudos de validação e validade funcional. Reduz o uso de animais em mais de 25%.
Krämer et al., 2009 ¹¹	Vacina antirrábica	VD	RFFIT		Estudo de correlação	Correlação de Pearson Coeficiente de correlação de concordância de Lin	O método sorológico pode ser recomendado.
Krämer et al., 2013 ¹³	Vacina antirrábica veterinária	VD	RFFIT modificado	Validações internas (in house)	Confiabilidade	Linearidade Paralelismo Limites de confiança	O número de animais de teste é reduzido em até 85%. O ensaio é mais barato, mais fácil e mais rápido.
Korimbocus et al., 2016 ⁴⁶	fragmentos F(ab)2 altamente purificados da imunoglobulina da antirrábica equina	NT	ELISA competitivo		Exatidão Precisão Linearidade Intervalo	Correlação	O ELISA competitivo demonstrou o potencial de substituir o NT e possivelmente o RFFIT para a quantificação da imunoglobulina da raiva.
Moreira et al., 2019 ⁶⁶	Vacina antirrábica	VD	RFFIT modificado		Relevância Confiabilidade	Teste Cochran C Teste t de Student ANOVA regressão linear simples coeficiente de Cohen Kappa Coeficiente de correlação de Lin intervalos de confiança	O ensaio foi capaz de distinguir entre lotes potentes e subpotentes. O SPT é um candidato viável para validação e inclusão em farmacopeias como redução e refinamento para o teste NIH.
Hendriksen et al., 1994 ⁴	Vacina veterinária de toxoide tetânico	VD	ELISA indireto ToBI HA		Varição intra e interlaboratorial	Correlação Linearidade	VD pode ser substituído por ELISA e ToBI. É necessário padronizar o HA.
de Kappelle et al., 1997 ⁶	Vacina de célula inteira contra coqueluche	VD	VD	Estudo colaborativo	Reprodutibilidade variação interlaboratorial	ANOVA	A padronização internacional dos protocolos é necessária, a variabilidade pode ser atribuída à cepa de camundongos.

Continua



Continuação

Hunolstein et al., 2008 ³⁷	Vacina de célula inteira contra coqueluche	VD	Ensaio com células CHO ELISA	Estudo colaborativo fase I	Repetibilidade (precisão intra-ensaio) e precisão intermediária (variação intralaboratorial)	Correlação	Método alternativo promissor para testar a potência na liberação de lotes de vacinas cuja consistência de produção já tenha sido demonstrada pelo VD clássico.
Morgeaux et al., 2017 ⁴⁵	Vacina antirrábica	VD	ELISA		Relevância	Especificidade Linearidade Exatidão Precisão Repetibilidade	O ELISA pode discriminar entre lotes potentes e subpotentes. Variabilidade inerente ou falta de transferibilidade que não foi encontrada.
Gross et al., 2009 ¹⁰	Imunoglobulina tetânica humana	NT	EIA TIA	Estudo colaborativo fase II	Precisão, Repetibilidade e Reprodutibilidade	EIA - linhas paralelas TIA - curva logística de 4 parâmetros Correlação de Lin ANOVA	Avaliação de desvios de paralelismo e linearidade juntamente com o coeficiente de correlação ponderado.
Roskopf-Streicher et al., 2001 ⁵¹	Vacina contra Erysipela	VD	ELISA	Estudo colaborativo fase III	Confiabilidade Reprodutibilidade (variação interlaboratorial) Repetibilidade (variação intralaboratorial)	Correlação ANOVA	Refinamento e redução substanciais do número de animais em 80%. Foi incluído na Farmacopeia Europeia.
Roskopf-Streicher et al., 1999 ⁵⁰	Vacina contra Erysipela	VD	ELISA		Reprodutibilidade	NI	O método é um forte candidato para validação. Utiliza o termo reprodutibilidade intralaboratorial como repetibilidade.
van der Ark et al., 2000 ⁷	Vacina de célula inteira contra coqueluche	VD	ELISA		Reprodutibilidade Confiabilidade Relevância	Precisão intra e interensaio e interlaboratorial Correlação	O modelo é válido para estimar a potência da coqueluche.
Winsnes et al., 2003 ⁸	Vacina combinada - componente toxoide diftérico	VD	ToBI ELISA indireto de neutralização de toxinas em células Vero <i>in vitro</i>	Estudo colaborativo fase I, II	Repetibilidade	ELISA e ToBI - curva logística multiparâmetros Ensaio célula Vero e ELISA ou ToBI - linhas paralelas Correlação	Os ensaios sorológicos podem ser menos problemáticos do que os de desafio. Os resultados obtidos recomendaram prosseguir com o estudo para investigar a confiabilidade dos ensaios <i>in vitro</i> .
Krämer et al., 2010 ¹²	Vacina antirrábica veterinária	VD	RFFIT		Reprodutibilidade Confiabilidade Transferibilidade Adequação	Teste exato de Wilcoxon-Mann-Whitney	Melhoria significativa de 3R no número de animais e refinamento. Redução do tempo de teste.
Winsnes et al., 2006 ³⁶	Vacina combinada - componente toxoide diftérico	VD	ToBI ELISA indireto de neutralização de toxinas em células Vero <i>in vitro</i>	Estudo colaborativo fase III	Repetibilidade e reprodutibilidade	Correlação	A substituição e a possibilidade de testar as potências de toxoide diftérico e tetânico dos soros dos mesmos animais.
Winsnes e Hendriksen, 2000 ³⁵	Vacina de toxoide tetânico	VD	ToBI ELISA	Estudo colaborativo fase I, II, III	variação intra e interlaboratorial	Correlação de Pearson	Refinamento e redução do número de animais para liberação de lote.
Hendriksen, 1995 ⁵	Vacina de toxoide tetânico	VD	ToBI	Relato de caso	NA	NA	Apoiar a investigação de alternativas. Desenvolvimento de diretrizes para procedimento de validação.

NA: Não aplicável; VD: Ensaio de vacinação-desafio; NI: Não identificado.

ToBI: Teste de inibição de ligação à toxina; ELISA: Ensaio imunoabsorvente ligado a enzima; TRFIA: Fluoroensaio tempo-dependente; RFFIT: Teste de rápida inibição de focos fluorescentes; NT: Teste de neutralização em camundongo; SPT: Teste de potência sorológica; NIH: National Institute of Health; HA: Teste de hemaglutinação passiva; CHO: Ovário de hamster chinês; EIA: Imunoensaio ligado a enzima; TIA: Ensaio de inibição de toxoides.



Modelos para toxoides tetânicos

Vacinas humanas

Estudos anteriores relataram uma maior correlação entre o teste de neutralização de toxinas (NT) em camundongos e o teste de inibição de ligação a toxinas (ToBI) do que com o ensaio de imunoabsorção ligado à enzima toxoide (ELISA)^{1,2}. Estes ensaios sorológicos não-NT avançaram a partir dos resultados de um estudo colaborativo para determinar a potência do toxoide tetânico em vacinas veterinárias⁴. As correlações entre os testes *in vitro* e o VD foram muito boas e um pouco melhores no ToBI do que no ELISA.

As informações sobre a variação intralaboratorial dos ensaios sorológicos (ES) *in vitro* foram baseadas na avaliação da repetibilidade dos testes e na distribuição da precisão intralaboratorial. A análise de variação intralaboratorial mostrou que o ELISA tem melhor repetibilidade que o ToBI, enquanto que as informações preliminares sobre a variação interlaboratorial foram consideradas aceitáveis. Os resultados justificaram a extensão a um estudo colaborativo para determinar a variação intra e interlaboratorial dos ensaios *in vitro* e a conclusão sobre robustez. Por fim, concluiu-se que esses testes sorológicos são importantes para garantir a consistência do lote, mas não podem ser utilizados para substituir os testes de VD para o licenciamento de novas vacinas ou a confirmação de potência após alterações significativas dos processos de fabricação³⁵.

Os métodos *in vitro* foram avaliados em um estudo colaborativo para o ES de validação de potência de vacinas contra difteria combinadas com toxoide tetânico para uso humano. Os ensaios ELISA ou ToBI para sorologia do tétano foram realizados e comparados com o ensaio VD *in vivo*. Em geral, o ToBI gerou uma potência maior do que o ELISA, pois as doses da vacina foram otimizadas para o componente diftérico. Como já era esperado, as atividades séricas variam amplamente entre as vacinas multiuso, levantando questões sobre o uso de um modelo de linha paralela. Os coeficientes de correlação foram considerados aceitáveis e a potência estimada no ensaio de desafio foi semelhante à do ELISA. Os dados obtidos mostraram que a potência da antitoxina obtida pelo ensaio de células Vero e ELISA estava altamente correlacionada com a potência por neutralização⁸.

Embora a palavra “validação” tenha sido incluída no título do estudo, os autores indicaram a necessidade de investigar a confiabilidade de ensaios *in vitro*, demonstrando que a validação em si não foi de fato realizada. No entanto, a pré-validação claramente relatada incluiu uma descrição detalhada do desenho do estudo e seu desenvolvimento. Nesta etapa, um estudo de correlação avaliou a relevância dos testes candidatos. Também seria possível obter dados preliminares de confiabilidade⁸.

No estudo colaborativo sobre vacinas com componentes toxoides diftéricos e tetânicos, pode-se observar uma regressão clara nos resultados de ELISA e ToBI. Essa observação é importante porque as doses da vacina foram ótimas para o componente toxoide diftérico. Os resultados revelaram que os mesmos soros poderiam ser usados para determinar a potência de ambos os componentes. A repetibilidade e reprodutibilidade foram geralmente mais

altas para toxoides no ELISA que no ToBI. O estudo considerou o ELISA e o ToBI como métodos válidos para testes rotineiros de liberação em lote de vacinas combinadas contra o tétano³⁶.

Vacinas veterinárias

A adequação de ES in vitro para testar a potência do toxoide tetânico de vacinas veterinárias foi verificada por um estudo de validação interlaboratorial. Os títulos de anticorpos séricos de cobaias e coelhos imunizados foram estimados por ELISA indireto, ToBI e ensaio de hemaglutinação passiva (HA), em comparação com o NT. A potência estimada mostrou boa concordância, mas uma variação interlaboratorial significativa para a HA e aceitável para ELISA e ToBI. Os resultados permitiram concluir que ELISA e ToBI são alternativas válidas, mas o teste de HA não é⁴.

Imunoglobulina tetânica

Dois outros modelos alternativos *in vitro* foram validados para determinar a potência da imunoglobulina humana contra o tétano. Um ensaio imuno-enzimático (EIA) e um ensaio de inibição de toxinas (TIA) mostraram boa reprodutibilidade, precisão e repetibilidade em um estudo colaborativo internacional. Os métodos discriminaram entre baixa, média e alta potência, portanto, foram considerados adequados para o controle da qualidade da imunoglobulina tetânica humana¹⁰.

O EIA e o TIA foram submetidos a um estudo colaborativo complementar para serem validados em produtos de alta potência. Os ensaios foram capazes de reconhecer amostras de baixa, média e alta potência utilizando um conceito de precisão entendido como confiabilidade, uma vez que determinou as variações intra- (repetibilidade) e interlaboratoriais (reprodutibilidade)¹⁰.

Modelos para coqueluche

Um ELISA sorológico foi desenvolvido para avaliar a resposta humoral induzida pela vacina de células inteiras como alternativa ao modelo de desafio intracerebral, verificando que a sobrevivência dos camundongos poderia ser prevista pelos títulos de anticorpos no dia do desafio. Os resultados da potência da vacina foram semelhantes, mas a reprodutibilidade foi melhor no ELISA. Os níveis de sofrimento dos animais foram mais baixos e reduziu-se em 25% o número de animais utilizados³.

Foi aplicado o teste do qui-quadrado para verificar a homogeneidade dos resultados; a análise de variância e o coeficiente de correlação de regressão foram calculados para estimar o que os autores definiram como reprodutibilidade. Atualmente, o conceito aplicável seria repetibilidade, pois trata-se uma validação intralaboratorial^{25,67}.

Um estudo colaborativo foi realizado para estabelecer a precisão e exatidão de cinco sistemas de ensaio. A toxicidade e a potência da vacina de células inteiras contra a coqueluche foram avaliadas em camundongos pelo teste VD, e mostrou variação significativa e baixa capacidade de discriminar diferentes níveis de potência. A reprodutibilidade foi determinada pela estimativa da potência no ensaio VD. Os dados do sistema foram testados quanto à homogeneidade



entre os laboratórios por análise de variância (ANOVA), utilizando estimativas médias dos produtos testados e o desvio-padrão médio. A consistência intralaboratorial também foi avaliada pela ANOVA, bem como a capacidade de cada sistema de teste distinguir entre produtos com toxicidade ou potência diferentes⁶.

Outro estudo colaborativo verificou a correlação e comparou a relevância e a confiabilidade do teste de potência sorológica para *Bordetella pertussis*. Na validação do ELISA, as precisões intra- e interensaios e interlaboratoriais foram determinadas pelo coeficiente de variação (CV%) das concentrações de anticorpos. A precisão intra-ensaio (repetibilidade) avaliou as diferenças dentro ou entre as placas. A variação dentro dos laboratórios foi expressa pela precisão intermediária (variação interensaios). A reprodutibilidade (precisão interlaboratorial) foi calculada pela variação entre os laboratórios participantes. Os testes intra e interlaboratoriais apresentaram boa correlação no teste de homogeneidade pelo qui-quadrado. Os valores de potência foram semelhantes, mas o ELISA foi mais reprodutível, com possibilidade reduzida de re-teste devido aos menores intervalos de confiança. A reprodutibilidade e a confiabilidade foram determinadas pela análise da potência estimada (média geométrica, variância média e valores de p do qui-quadrado). Os conceitos de precisão e exatidão foram aplicados como sinônimos de confiabilidade (precisão intra e interlaboratorial) e relevância, respectivamente⁷.

Um estudo avaliou dois métodos sorológicos para teste de potência de vacinas de células inteiras contra coqueluche³⁷, um ELISA para toxina de coqueluche (PT-ELISA), ELISA de células inteiras (wC-ELISA) e anticorpos neutralizantes pelo ensaio de células CHO (ovário de hamster chinês). O ensaio de células CHO foi considerado confiável devido à boa repetibilidade (precisão intra-ensaio) e precisão intermediária (variação intralaboratorial). A potência estimada pelo VD não mostrou correlação com o PT-ELISA, mas correlacionou-se muito bem com o wC-ELISA da maioria das amostras do estudo, mostrando boa reprodutibilidade intra e interlaboratorial. O ensaio apresentou boa transferibilidade. O ES baseado no wC-ELISA é um método alternativo promissor para teste de potência na liberação de lote de vacinas contra coqueluche, cuja consistência de produção já foi demonstrada pelo teste de desafio clássico. No entanto, são necessários dados adicionais de validação para estabelecê-lo como um método alternativo compendial.

Modelos para difteria

Um estudo colaborativo utilizou um ES para validação da potência de vacinas contra difteria em combinação com toxoide tetânico para uso humano. Os ensaios de neutralização de toxinas *in vitro* em células Vero e o ELISA para sorologia de difteria foram comparados com o ensaio *in vivo* VD em cobaias ou desafio intradérmico⁶⁸. Os dados obtidos mostraram que a potência da antitoxina obtida pelo ensaio de células Vero e o ELISA de difteria estavam altamente correlacionadas com a potência no teste de neutralização. Os experimentos realizados compararam as estimativas de potência, e os coeficientes de correlação calculados demonstraram a similaridade entre os testes ES e VD. Embora a palavra validação (não realizada) tenha sido incluída no título do estudo, os autores indicaram a necessidade de investigar a confiabilidade (variação intra e interlaboratorial) dos ensaios *in vitro*⁸.

Com o objetivo de complementar o estudo colaborativo anterior, a relevância e a confiabilidade do ensaio de células Vero e o ELISA foram avaliados para testes de potência de vacinas de difteria combinadas contendo toxoide tetânico. Também foi investigado se os soros dos mesmos animais poderiam ser utilizados para determinar a potência dos toxoides diftéricos e tetânicos para reduzir o número de animais utilizados. A confiabilidade dos ensaios sorológicos foi investigada através da determinação da repetibilidade e reprodutibilidade do teste, que geralmente eram mais altas no ELISA em comparação com o ensaio de células Vero³⁶.

Imunobiológicos para raiva

Vacinas para uso humano

O teste de desafio em camundongos aplica-se ao teste de potência de vacinas inativadas para uso veterinário e humano^{69,70}. Modelos de quantificação para a substituição total de animais medem a quantidade de antígeno ou imunógeno da vacina, incluindo o teste de ligação ao anticorpo para raiva (TLA)⁷¹, alguns procedimentos ELISA⁴²⁻⁴⁴ e o ensaio de imunodifusão radial simples (SRID)⁷², que é aceito para liberação de lotes de vacina para uso humano⁷³. A Ph. Eur. propõe o método de VD para vacinas humanas e, alternativamente, um ensaio de potência imunológico ou sorológico validado⁷⁰, incluindo o ELISA, para quantificar a glicoproteína G viral em vacinas antirrábicas humanas sem adjuvante⁴⁵.

Como parte dos esforços gerais para reduzir os testes em animais, três ELISA diferentes para quantificar a glicoproteína da raiva foram avaliados como alternativa ao teste de potência do National Institutes of Health (NIH). O escolhido é baseado em anticorpos monoclonais específicos para a proteína G viral na forma nativa. O método, foi considerado específico, linear, exato e preciso, conseguiu distinguir entre lotes de vacinas potentes e subpotentes, concordando satisfatoriamente com o teste de VD. A repetibilidade, especificidade, linearidade e precisão foram avaliadas no estudo de pré-validação. O estudo de correlação mostrou uma boa concordância com o teste NIH. Este ELISA foi considerado um bom candidato e, portanto, selecionado para um estudo colaborativo⁴⁵ que deve gerar dados científicos para apoiar as etapas regulatórias necessárias para substituir os testes de potência *in vivo*⁴⁷.

Foi desenhado um fluoroimunoensaio tempo-dependente (TRFIA) utilizando anticorpos monoclonais específicos que reconhecem apenas a forma nativa, trimérica e imunogênica da glicoproteína do vírus da raiva, impedindo a detecção de glicoproteína solúvel e não imunogênica nas vacinas. Ele estima a potência e o teor de glicoproteína das vacinas contra a raiva humana e pode ser útil para substituir o teste NIH. O TRFIA mostrou excelente precisão, maior sensibilidade e uma faixa de detecção muito mais ampla que o ELISA tradicional. Embora a alta sensibilidade possa não ser muito importante para a detecção da proteína do vírus da raiva, a faixa de detecção muito mais ampla, a excelente precisão e a operação mais simples do TRFIA podem economizar tempo e trabalho com muitas determinações precisas e exatas⁶⁷.

Um ES utilizando o Teste de Rápida Inibição de Focos Fluorescentes Modificado (mRFFIT) foi desenvolvido e pré-validado,



demonstrando sua relevância, confiabilidade e boa concordância com as potências determinadas pelo teste NIH. O ensaio foi capaz de distinguir entre lotes de vacinas potentes e subpotentes, sendo um candidato viável para validação produzindo refinamento para o teste NIH⁶⁶.

Vacinas veterinárias contra a raiva

Pesquisadores desenvolveram e validaram um teste sorológico de dose única para a vacina veterinária que reduziu o número de animais e promoveu um refinamento considerável. O estudo comparativo mostrou uma boa correlação entre o teste de VD e os resultados do ES com base no teste Rápida de Inibição de Focos Fluorescentes (RFFIT). A equivalência foi avaliada pelo coeficiente de correlação de Lin, enquanto a confiabilidade do ES foi demonstrada pela identificação das vacinas que não atenderam às especificações mínimas de potência¹¹. Um estudo colaborativo validou esse ES de dose única, demonstrando a reprodutibilidade do teste, a confiabilidade e as boas variações intra e interlaboratoriais. O método proposto permite uma melhoria significativa em relação à repetibilidade e reprodutibilidade do ensaio, ao passo que a transferibilidade dos resultados e a adequação do teste complementaram a validação¹².

O método alternativo sorológico de dose única foi incluído na Monografia 0451 da Ph. Eur. como método de refinamento para o teste de VD em camundongos na liberação em lote de vacinas veterinárias contra raiva⁶⁹. Este teste fornece resultados qualitativos, mas não um valor de potência. O conceito de confiabilidade foi aplicado, embora a repetibilidade tenha sido avaliada apenas quando não combinada com a reprodutibilidade¹².

Posteriormente, os mesmos grupos de pesquisa desenvolveram um método sorológico em formato de doses múltiplas que permitiu determinar a potência das vacinas e forneceu resultados confiáveis e mais exatos do que o teste de VD¹³.

Foi desenvolvido um ELISA utilizando anticorpos monoclonais caracterizados capaz de quantificar apenas o tipo nativo trimérico de glicoproteína G, alvo de anticorpos neutralizantes. Foi demonstrado que este ensaio funciona em diferentes etapas do processo de fabricação, incluindo o vírus viável ou inativado e o antígeno formulado no produto final. Ele pode ser utilizado para acompanhar a consistência lote a lote entre as várias etapas do processo de fabricação. Uma das principais vantagens deste ELISA é sua especificidade, robustez e precisão⁵⁴.

Imunoglobulina antirrábica

De acordo com os regulamentos internacionais, o controle da qualidade de fragmentos F(ab)₂ altamente purificados produzidos a partir de imunoglobulina da raiva equina (F(ab)₂ - ERIGs) requer avaliação da potência in vivo por NT ou RFFIT. Um método ELISA competitivo (c-ELISA) foi desenvolvido, validado e avaliado em lotes de produtos comerciais. A validação do c-ELISA tem o potencial de substituir o NT e possivelmente o RFFIT para quantificação de imunoglobulina antirrábica. Um estudo de correlação comparou o c-ELISA e NT utilizando a análise de regressão, incluindo ANOVA⁴⁶.

Modelo para Erisipela

Um ELISA foi desenvolvido para refinar e reduzir o modelo baseado em desafio para vacinas veterinárias contra erisipela suína⁴⁹ e, após estudo de pré-validação⁵⁰, um estudo internacional colaborativo foi realizado para determinar a reprodutibilidade e a precisão intralaboratorial. O ELISA substituiu adequadamente o teste VD e reduziu em 80% o número de animais no teste de potência⁵¹. Durante as fases de pré-validação e validação, a transferibilidade foi demonstrada pelos parâmetros de precisão, repetibilidade, reprodutibilidade e robustez. O estudo de validação confirmou a utilidade do método proposto para uma ampla gama de vacinas inativadas contra erisipela. Em 2004, o ES foi incluído na Ph. Eur.⁷⁴.

DISCUSSÃO

Considerações sobre estudos de validação

Falta de harmonização na terminologia estatística

Embora as principais diretrizes indiquem os mesmos parâmetros, a terminologia de validação utilizada difere⁷⁵ em diversos documentos oficiais^{25,55,56,57,58,59,60,61,62,67,76,77}, o que pode causar problemas em estudos de validação. Além disso, essa terminologia heterogênea pode ser encontrada até no mesmo documento algumas vezes, dependendo da seção em que um termo específico é mencionado⁷⁵.

A ISO 3534-2 diferencia claramente medições de testes. A medição é limitada a determinar quantidades (massa, comprimento, tempo, velocidade), enquanto que o teste é utilizado em um sentido mais amplo ao determinar características por medição ou por outros meios, como quantificar, classificar ou detectar a presença ou ausência de uma característica. A ISO define um teste como uma operação técnica que consiste em determinar uma ou mais características⁷⁷.

A terceira edição do IVM afirma que os princípios básicos de medição em física, química, medicina laboratorial, biologia e engenharia não são fundamentalmente diferentes. O IVM⁶⁷, a ISO^{75,77} e a rede europeia de medições químicas analíticas (EURACHEM)⁶² se referem à exatidão como veracidade, e a melhor definição é fornecida pelas normas ISO⁷⁵ e a EURACHEM⁶², como a combinação da veracidade e precisão. A veracidade é entendida como a proximidade de concordância entre um valor médio obtido de uma grande série de resultados e um valor de referência aceito, geralmente expresso em termos de tendência⁷⁸. O documento ICH Q6 (R2) estabelece as bases para a validação na área farmacêutica, mas apresenta termos equivocados, e outros guias (Farmacopeia dos Estados Unidos; EMA; Agência Reguladora de Saúde do Brasil - Anvisa) seguem tanto esse guia como seus termos.

A sensibilidade do teste é definida como a razão de amostras positivas com os resultados positivos e a especificidade a proporção de amostras negativas com resultados negativos. O valor preditivo positivo (VPP) de um teste é a proporção de resultados positivos que realmente o são, e o valor preditivo negativo (VPN) é a proporção de resultados negativos verdadeiros⁷⁹.

A exatidão do teste é definida como a capacidade de fornecer a medição mais próxima possível da substância avaliada em



relação ao valor de referência e está associada a um erro sistemático. A precisão descreve o grau de dispersão dos resultados dos testes replicados, independentemente do valor de referência e está relacionada ao erro aleatório⁶⁷.

A precisão do ensaio expressa a proximidade de concordância (grau de dispersão) em uma série de medições, e é considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. É geralmente expressa como variância, desvio-padrão ou coeficiente de variação. Para determinar a precisão intermediária, são avaliados os efeitos de eventos aleatórios na precisão do procedimento analítico, como dias, analistas, equipamentos, entre outros. A reprodutibilidade é testada por testes interlaboratoriais, indicados, por exemplo, para incluir procedimentos nas farmacopeias^{25,67}.

Análise Final

Foram desenhados vários estudos para validar métodos alternativos. O desafio, no entanto, é realizar um estudo de validação apropriado para obter aceitação regulatória.

Os estudos encontrados nesta pesquisa são multicêntricos (estudo colaborativo), internos (validação interna) e de validação de produto específico. O objetivo desses estudos colaborativos incluiu avaliações da adequação do teste como medida de potência válida e reprodutível, para demonstrar a relevância, a confiabilidade e a transferibilidade do teste, visando uma eventual inclusão nas farmacopeias^{4,6,78,10,12,51}. As pesquisas de validação intralaboratoriais consistiram na comparação de candidatos e métodos tradicionais. A validação de ensaios alternativos foi avaliada, verificando sua adequação e desenvolvimento^{1,2,3,11,13,45,46,50,66}. Um único artigo de pesquisa discutiu o desenvolvimento, a validação e a aceitação de um método alternativo para o controle da qualidade de vacinas⁵. Depois de validado em um estudo colaborativo, o método alternativo ainda exige validação adicional antes de ser transferido/implementado em produtos/laboratórios específicos, o que não foi mencionado na maioria dos estudos.

Aqui, classificamos os estudos levantados e identificamos essa etapa de transferência como validação interna, que variava caso a caso, apoiada em dados gerados pelo novo método e/ou no estudo colaborativo^{5,10,14, 25,60,62,75}.

A necessidade de validar os novos métodos ficou evidente por meio de procedimentos internacionalmente aceitos²⁵ devido a barreiras à aceitação e harmonização internacional ao aplicar métodos universais para controle e liberação de lotes de imunobiológicos. A validação precisa garantir que o método atenda aos requisitos das aplicações analíticas, garantindo a confiabilidade dos resultados⁵⁷.

Geralmente, os novos métodos precisam ser comparados com parâmetros já estabelecidos, o que dificulta muito o procedimento de validação. Como exemplo, algumas discussões e tentativas já foram feitas para substituir o teste de potência NIH para a vacina contra a raiva⁸⁰, porém sem sucesso, principalmente devido a abordagens conservadoras que exigem uma correlação entre métodos tradicionais e alternativos, o que raramente ocorre^{59,81,82}. Uma consideração importante é que, quando um teste *in vivo* for substituído por um teste *in vitro* para determinado produto, é provável que os atributos

do produto sejam avaliados de forma diferente⁶³. Não se pode esperar total conformidade dos valores de potência devido à alta variabilidade inerente aos experimentos com animais, já que os testes são baseados em diferentes leituras (por exemplo: sobrevivência-morte contra títulos de anticorpos)¹³. No entanto, quase todos os modelos estatísticos dos estudos de validação aplicam correlação com regressão linear para avaliar a similaridade dos resultados e determinar a confiabilidade e a relevância dos novos métodos.

Para a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), o desenvolvimento e a validação de ensaios de toxicidade têm etapas bem conhecidas. Apesar disso, diferenças nos processos de validação ainda impedem a aceitação dos novos métodos⁹, o que também parece ocorrer com os imunobiológicos. Porém, a recente publicação de diretrizes sobre validação de métodos alternativos com abordagem dos 3Rs pela EMA³⁹ e pelo Conselho da Europa⁶³ deve trazer um pouco mais de lógica ao planejamento de futuros estudos nessa área.

Ainda assim, não foi alcançado nenhum acordo universal sobre a definição de alguns dos termos utilizados em validação de ensaios, mas o IVM⁶⁷ foi substancialmente revisado, levando em consideração medições químicas e biológicas e uma alteração na abordagem da incerteza na medição de estimativa de erro⁶². Esse Vocabulário tem como objetivo promover a harmonização global da terminologia usada em metrologia⁶⁷, e sua utilização deve ser estimulada.

Das 22 abordagens de validação, quatro ensaios de potência foram incluídos nos compêndios farmacopeicos. Para comparar os resultados, os estudos estatísticos empregaram a avaliação de regressão para correlacionar os métodos^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,13,46,47,66}, incluindo ANOVA^{1,3,4,6,7,46,66} e o teste do qui-quadrado^{2,3,7,13}.

Proposta de harmonização da terminologia e métodos estatísticos apropriados

Alguns processos de validação são realizados sob a égide do Programa de Normalização Biológica (BSP) da Diretoria Europeia para a Qualidade de Medicamentos e Cuidados de Saúde. Para melhorar a harmonização internacional, sempre que possível, estudos colaborativos são coordenados com aqueles planejados e realizados pela OMS e FDA⁸³. Essa configuração do processo de validação dos métodos alternativos pode ser adotada globalmente para permitir a aceitação internacional dos novos métodos, incluindo uma organização local/regional, uma organização global como a OMS e uma terceira externa, onde o processo é centralizado. A padronização de métodos de teste para o controle da qualidade de produtos imunobiológicos e o desenvolvimento de métodos alternativos também é um facilitador das atividades da ICH e da Cooperação Internacional em Harmonização de Requisitos Técnicos para Registro de Medicamentos Veterinários (VICH).

Em geral, um estudo colaborativo é organizado como uma extensão de um estudo anterior, composto por duas partes (partes 1 e 2) que podem ser subdivididas em três fases consecutivas (fases I, II e III), permitindo a avaliação intermediária dos resultados dos testes e o acompanhamento do progresso do estudo. A parte 1 inclui as fases I e II. O estudo de pré-validação (fase I), realizado



em poucos laboratórios, indica se resultados comparáveis dos testes alternativos e tradicionais podem ser obtidos. Na fase II, um número maior de outros laboratórios é envolvido e mais informações sobre o ensaio tradicional e o ensaio alternativo são exploradas. À luz dos resultados obtidos nas duas primeiras fases, recomenda-se prosseguir para a fase III para investigar a confiabilidade dos ensaios *in vitro*, o que inclui a parte 2 do estudo colaborativo⁸, às vezes chamada de fase de viabilidade^{10,12}. No entanto, não há consenso sobre a organização das fases de validação, uma vez que existem estudos que descrevem quatro fases, separando a etapa de pré-validação da fase I, também chamada de fase-piloto^{7,35}.

Outro ponto fundamental a considerar é a aplicação apropriada de métodos estatísticos para procedimentos de validação de testes de potência alternativos. A Tabela 2 foi organizada para ajudar a projetar estudos colaborativos para processos de validação.

No que diz respeito aos métodos alternativos de validação para fins dos 3Rs, os objetivos seriam os mesmos que as validações na estrutura da ICH, uma vez que a relevância pode ser a capacidade do método de determinar um resultado que esteja de acordo com um valor de referência, e a confiabilidade uma medida da dispersão dos resultados, determinando a precisão.

Ao fazer a transição de um sistema de teste de controle da qualidade baseado em *in vivo* para *in vitro*, é importante entender o que os ensaios *in vivo* podem ou não oferecer. Isso pode ser um desafio em alguns casos, já que esforços repetidos por meio de estudos colaborativos internacionais multicêntricos podem falhar devido à variabilidade inerente aos métodos *in vivo*. Além disso, apesar de ter o potencial de medir respostas funcionais complexas para demonstrar a prova de conceito, os ensaios de potência *in vivo* não predizem necessariamente as respostas reais na população-alvo⁶³.

Os testes de potência para vacinas convencionais são específicos para um tipo de produto e utilizam uma referência específica que reflete sua natureza. No entanto, com uma faixa moderada, por exemplo: uma vacina de raiva humana de referência produzida em cultura de células pode ser usada para testar as principais classes de produtos disponíveis usando o ensaio de potência NIH, produzido em células diplóides humanas, células Vero ou células embrionárias de aves. Por outro lado, as vacinas modernas são cada vez mais purificadas e caracterizadas, sendo testadas em

ensaos de potência *in vitro* projetados durante seu desenvolvimento e, portanto, dependentes de insumos e padrões específicos para a preparação produzida pelos fabricantes, o que dificulta a avaliação pelos Laboratórios Nacionais de Controle. Portanto, os ensaios de potência da vacina tornam-se relativamente diferentes, com uma abordagem mais restrita durante a validação de métodos alternativos, incluindo o número geralmente limitado de produtos e fabricantes do mesmo tipo de vacina clássica²³.

A precisão é obtida no teste de confiabilidade, determinando a repetibilidade e a reprodutibilidade. Essa avaliação deve incluir uma análise estatística da variabilidade intra e interlaboratorial ou análise do coeficiente de variação. Quando o ensaio proposto é mecânica e funcionalmente semelhante a um método validado com padrões de desempenho estabelecidos, a confiabilidade dos dois métodos deve ser comparada⁹.

A potência deve estar correlacionada com a eficácia, mas um teste de potência não precisa necessariamente medir a eficácia diretamente. O teste deve, no entanto, ser capaz de detectar lotes com atividades diferentes das de um lote ou lotes cuja eficácia foi demonstrada. Portanto, dois aspectos básicos da validação precisam ser considerados: validação da correlação com eficácia e do próprio método³⁸.

Os procedimentos utilizados para demonstrar especificidade dependem do objetivo pretendido do ensaio. Para testes de potência, eles devem garantir um resultado que permita uma declaração precisa do conteúdo ou potência do analito na amostra. Testes de identificação apropriados devem ser capazes de discriminar resultados positivos em comparação com um material de referência, juntamente com resultados negativos²⁵. Testes baseados em reações imunológicas específicas ou efeitos de microrganismos inerentemente específicos não precisam ser avaliados quanto à especificidade⁶⁴.

A linearidade deve ser avaliada por inspeção visual de um gráfico em função da concentração ou do conteúdo do analito. Em alguns casos, antes da análise de regressão, os dados do teste precisam ser matematicamente transformados para obter linearidade entre os ensaios e as concentrações da amostra. Recomenda-se um mínimo de cinco concentrações para obter linearidade²⁵. Em geral, os testes de potência de produtos como vacinas não precisam demonstrar a linearidade característica, pois sempre é utilizada a mesma dose, independentemente de idade, peso, entre outros⁶⁴.

Tabela 2. Proposta de desenho de estudos colaborativos: validação e etapas do desenvolvimento de testes de potência.

Partes	Fases	Estágios de desenvolvimento	Ficha de dados
1	I - Pré-validação	Desenho	Definição das características do teste. Descrição e justificativa da proposta de validação - Suporte regulatório
	II	Desenvolvimento e Refinamento	Confiabilidade - Precisão (variação intra e interlaboratorial, repetibilidade e reprodutibilidade) Relevância (exatidão - sensibilidade e especificidade) - avaliação de desempenho
2	III - Validação	Qualificação do ensaio	Determinar confiabilidade e relevância
			Considerações sobre bem-estar animal (redução, refinamento e substituição)
			Considerações práticas (avaliação crítica dos pontos fortes e limitações)
			Considerações de qualidade (processo de implementação do teste)

Fonte: Adaptado de BSP e OCDE^{9,83}.



O intervalo especificado é geralmente derivado de estudos de linearidade e estabelecido como as doses ou concentrações do intervalo testado em que o ensaio tem um grau aceitável de veracidade e precisão ou, melhor dizendo, de exatidão²⁵.

CONCLUSÕES

A configuração dos estudos de validação deve incluir uma organização local/regional, uma organização global como a OMS e uma terceira externa, na qual o processo é centralizado, com competência na padronização de produtos biológicos. Essa configuração pode ser adotada globalmente

para fornecer harmonização e aceitação internacional dos novos métodos.

É desafiador realizar estudos de validação apropriados que sejam amplamente aceitos pelas autoridades reguladoras, especialmente onde ainda não foram estabelecidos centros de validação. A terminologia utilizada é crítica e requer harmonização global, bem como a aplicação de métodos estatísticos apropriados.

A pesquisa, desenvolvimento, validação e harmonização de procedimentos alternativos de controle podem levar à redução, refinamento ou mesmo substituição do uso de animais em testes de potência para imunobiológicos.

REFERÊNCIAS

1. Hendriksen CFM, Van Der Gun JW, Nagel J, Kreeftenberg JG. The toxin binding inhibition test as a reliable in vitro alternative to the toxin neutralization test in mice for the estimation of tetanus antitoxin in human sera. *J Biol Stand*. 1988;16(4):287-97. [https://doi.org/10.1016/0092-1157\(88\)90017-0](https://doi.org/10.1016/0092-1157(88)90017-0)
2. Hendriksen CFM, Van Der Gun JW, Marsman FR, Kreeftenberg JG. The use of the in vitro toxin binding inhibition (ToBI) test for the estimation of the potency of tetanus toxoid. *Biologicals*. 1991;19(1):23-9. [https://doi.org/10.1016/1045-1056\(91\)90020-K](https://doi.org/10.1016/1045-1056(91)90020-K)
3. Ark A, Kappelle IS, Akkermans A, Hendriksen C, Van Der Donk HJM. Development of pertussis serological potency test: serological assessment of antibody response induced by whole cell vaccine as an alternative to mouse protection in an intracerebral challenge model. *Biologicals*. 1994;22(3):233-42. <https://doi.org/10.1006/biol.1994.1034>
4. Hendriksen CFM, Woltjes J, Akkermans AM, Van Der Gun JW, Marsman FR, Verschure MH et al. Interlaboratory validation of in vitro serological assay systems to assess the potency of tetanus toxoid in vaccines for veterinary use. *Biologicals*. 1994;22(3):257-68. <https://doi.org/10.1006/biol.1994.1037>
5. Hendriksen CFM. Development, validation and acceptance of alternative methods in the quality control of vaccines: a case report. *Toxicol Vitro*. 1995;9(6):815-9. [https://doi.org/10.1016/0887-2333\(95\)00088-7](https://doi.org/10.1016/0887-2333(95)00088-7)
6. Kappelle IS, Van Der Gun JW, Marsman FR, Hendriksen CFM, Van Der Donk HJM. Collaborative study on test systems to assess toxicity of whole cell pertussis vaccine. *Biologicals*. 1997;25(1):41-57. <https://doi.org/10.1006/biol.1996.0059>
7. Ark A, Kappelle IS, Ólander RM, Enssle K, Jadhav S, Van Der Donk HJM et al. The pertussis serological potency test collaborative study to evaluate replacement of the mouse protection test. *Biologicals*. 2000;28(2):105-18. <https://doi.org/10.1006/biol.2000.0247>
8. Winses R, Sesardic D, Daas A, Behr-Gross M-E. Collaborative study for the validation of serological methods for potency testing of diphtheria toxoid vaccines part 1. *Pharmeur Bio*. 2003;(2):35-68.
9. Organization for Economic Co-Operation and Development - OECD. Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. Paris: Organization for Economic Co-Operation and Development; 2005.
10. Gross S, Janssen SWJ, Vries B, Terao E, Daas A, Buchheit K-H. Collaborative study for the validation of alternative in vitro potency assays for human tetanus immunoglobulin. *Pharmeur Bio Sci Notes*. 2009;(1):11-25.
11. Krämer B, Schildger H, Behrendorf-Nicol HA, Hanschmann KM, Duchow K. The rapid fluorescent focus inhibition test is a suitable method for batch potency testing of inactivated rabies vaccines. *Biologicals*. 2009;37(2):119-26. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.01.001>
12. Krämer B, Bruckner L, Daas A, Milne C. Collaborative study for validation of a serological potency assay for rabies vaccine (inactivated) for veterinary use. *Pharmeur Bio Sci Notes*. 2010;(2):37-55.
13. Krämer B, Kamphuis E, Hanschmann K-M, Milne C, Daas A, Duchow K. A multi-dose serological assay suitable to quantify the potency of inactivated rabies vaccines for veterinary use. *Biologicals*. 2013;41(6):400-6. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.08.003>
14. Metz B, Hendriksen CFM, Jiskoot W, Kernsten GFA. Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. *Vaccine*. 2002;20(19/20):2411-30. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00192-5](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00192-5)
15. Mattia F, Hendriksen CFM, Buchheit KH, Chapsal JM, Halder M, Lambrigts D et al. The vaccines consistency approach project: an EPAA initiative. *Pharmeur Bio Sci Notes*. 2015;30-56.
16. Ranhein T, Mozier N, Egan W. Vaccine potency assays. In: Nunnally BK, Turula VE, Sitrin RD, editors. *Vaccine analysis: strategies, principles and control*. Berlin: Springer-Verlag; 2015. p. 521-42.
17. Habel K. Habel test for potency. In: Meslin F, Kaplan MM, Koprowski H, editors. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. Geneva: WHO; 1996. p. 369-73.



18. Seligmann Jr EB. Potency-test requirements of the United States National Institute of Health (NIH). In: Meslin F, Kaplan MM, Koprowski H, editors. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva: WHO; 1996. p.145.
19. Wilbur LA, Aubert MFA. The NIH test for potency. In: Meslin F, Kaplan MM, Koprowski H, editors. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva: WHO; 1996. p. 360-8.
20. Hendriksen CFM. A short history of the use of animals in vaccine development and quality control. In: Brown F, Cussler K, Hendriksen CFM, editors. Replacement, reduction and refinement of animal experiments in the development and control of biological products. Basel: Karger; 1996. p.3-10.
21. André FE. Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises. *Vaccine*. 2003;21(7/8):593-5. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00702-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00702-8)
22. Hendriksen CF. Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. *Expert Rev Vaccines*. 2009;8(3):313-22. <https://doi.org/10.1586/14760584.8.3.313>
23. Balls M, Blaauboer B, Brusick D, Frazier J, Lamb D, Pemberton M et al. Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on the validation of toxicity test procedures. *Altern Lab Anim*. 1990;18:313-37.
24. Balls M, Blaauboer BJ, Fentem JH, Bruner L, Comber RD, Ekwall B et al. Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. *Altern Lab Anim*. 1995;23:129-47.
25. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use - ICH. ICH-Q2(R1) Validation of analytical procedures: text and methodology. Geneva: ICH; 2005.
26. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use - ICH. ICH-Q6B Test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products. Geneva: ICH; 1999.
27. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use - ICH. (SW) Stability testing of biotechnological/biological products. Geneva: ICH; 1995.
28. Peltzman S. An evaluation of consumer protection legislation: the 1962 drug amendments. *J Political Econ*. 1973;81(5):1049-91.
29. Yang H. Emerging non-clinical biostatistics in biopharmaceutical development and manufacturing. Boca Raton: CRC Press; 2016.
30. Woodcock J. Reliable drug quality: an unresolved problem. *PDA J Pharm Sci Technol*. 2012;66(3):270-2. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2012.00868>
31. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use - ICH. (SW) ICH-Q9 Quality risk management. Geneva: ICH; 2005.
32. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use - ICH. (SW) ICH-Q10 Pharmaceutical quality system. Geneva: ICH; 2008.
33. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use - ICH. (SW) ICH-Q8 (R2) Pharmaceutical development. Geneva: ICH; 2009.
34. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RDC Nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. *Diário Oficial União*. Apr 1, 2010.
35. Winsnes R, Hendriksen C. Collaborative study for the validation of serological methods for potency testing of tetanus toxoid vaccines for human use: part 1. *Pharmeuropa Bio*. 2000;(1):83-124.
36. Winsnes R, Sesardic D, Daas A, Behr-Gross ME. Collaborative study for the validation of serological methods for potency testing of diphtheria toxoid vaccines: part 2. *Pharmeuropa Bio*. 2006;(1):73-88.
37. Hunolstein C, Miguel MJG, Pezzella C, Scopetti F, Behr-Gross M-E, Halder M et al. Evaluation of two serological methods for potency testing of whole cell pertussis vaccines. *Pharmeuropa Bio*. 2008;(1):7-18.
38. Hendriksen C, Spieser JM, Akkerman A, Balls M, Bruckner L, Cussler K et al. Validation of alternative methods for the potency testing of vaccines. *Altern Lab Anim*. 1998;26(6):747-61.
39. European Medicines Agency - EMA. Guidance for individual laboratories for transfer of quality control methods validated in collaborative trials with a view to implementing 3rs. London: European Medicines Agency; 2017[access Jan 7, 2019]. Available at: https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guidance-individual-laboratories-transfer-quality-control-methods-validated-collaborative-trials_en.pdf
40. Lang C, Kolaj-Robin O, Cirefice G, Taconet L, Pel E, Jouette S et al. Replacement, reduction, refinement: animal welfare progress in european pharmacopoeia monographs: activities of the european pharmacopoeia commission from 2007 to 2017. *Pharmeur Bio Sci Notes*. 2018:12-36.
41. Kreeftenberg JG. Consistency testing of diphtheria and tetanus to replace potency testing for lot release. *Dev Biol (Basel)*. 2002;111:291-8.
42. Perrin P, Morgeaux S, Sureau P. In vitro rabies vaccine potency appraisal by ELISA: advantages of the immunocapture method with a neutralizing anti-glycoprotein monoclonal antibody. *Biologicals*. 1990;18(4):321-30. [https://doi.org/10.1016/1045-1056\(90\)90037-Z](https://doi.org/10.1016/1045-1056(90)90037-Z)
43. Rooijackers E, Groen J, Uittenbogarrd J, Van Herwijnen J, Osterhaus A. Development and evaluation of alternative testing methods for the in vivo NIH potency test used for the quality control of inactivated rabies vaccines. *Dev Biol Stand*. 1996;86:137-45.
44. Gamoh K, Senda M, Itoh O, Muramatsu M, Hirayama N, Koike R et al. Use of ELISA for in vitro potency test of rabies vaccines for animal use. *Biologicals*. 1996;24(2):95-101. <https://doi.org/10.1006/biol.1996.0012>



45. Morgeaux S, Poirier B, Ragan CI, Wilkinson D, Arabin U, Guinet-Morlot F et al. Replacement of in vivo human rabies vaccine potency testing by in vitro glycoprotein quantification using ELISA: results of an international collaborative study. *Vaccine*. 2017;35(6):966-71. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.12.039>
46. 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*. 2016;34(28):3310-6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.086>
47. Chabaud-Riou M, Moreno N, Guinard F, Nicolai MC, Niogret-Siohan E, Seve N et al. G-protein based ELISA as a potency test for rabies vaccines. *Biologicals*. 2017;46:124-9. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2017.02.002>
48. Guanfeng L, Shaolang C, Hui Z, Junyu L, Qiaoting D, Rongliang L et al. A time-resolved fluoroimmunoassay to assay the rabies virus glycoprotein: application for estimation of human rabies vaccine potency. *Nature Sci Rep*. 2017;7(7288):1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07687-7>
49. Beckmann R, Cussler K. Wirksamkeitsprüfung von rotlaufimpfstoffen an der labormaß: ELISA kontra infektionsversuch. *Altex*. 1994;11(Suppl. 1):39-45.
50. Roskopf-Streicher U, Johannes S, Wilhelm M, Gyra H, Cussler K. Potency testing of swine erysipelas vaccines by serology: results of a pre-validation study. *Altex*. 1999;16(3):123-28.
51. Roskopf-Streicher U, Johannes S, Wilhelm M, Cussler K. Quality control of inactivated erysipelas vaccines: results of an international collaborative study to establish a new regulatory test. *Vaccine*. 2001;19(11/12):1477-83. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00346-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00346-7)
52. Schiffelers MJ, Blaauboer B, Bakker W, Hendriksen C. Replacing the NIH test for rabies vaccine potency testing: a synopsis of drivers and barriers. *Biologicals*. 2014;42(4):205-17. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2014.04.001>
53. Gross S, Volkers P, Eckert-Ziem M, Kuschel S, Schäffner G. Validation of in vitro potency assays for tetanus immunoglobulin. *Pharmeuropa Bio*. 2006;(1):1-14.
54. Sigoillot-Claude C, Battaglio M, Fiorucci M, Gillet D, Vimort AS, Giraud Y et al. A versatile in vitro ELISA test for quantification and quality testing of infectious, inactivated and formulated rabies virus used in veterinary monovalent or combination vaccine. *Vaccine*. 2015;33(32):3843-9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.091>
55. United States Pharmacopoeia - USP. USP 35: NF 30:106 <111> Design and analysis of biological assays. North Bethesda: United States Pharmacopoeia; 2017[access May 15, 2018]. Available at: <http://www.usp.org/meetings-courses/workshops/past-uspworkshops/usp-bioassay-guidance-chapters>
56. United States Pharmacopoeia - USP. USP 35: NF 30:162 <1032> Development and design of biological assays. North Bethesda: United States Pharmacopoeia; 2017[access May 15, 2018]. Available at: [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)
57. United States Pharmacopoeia - USP. USP 35: NF 30:5174 <1033> Biological assay validation. North Bethesda: United States Pharmacopoeia; 2017[access May 15, 2018]. Available at: [http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/2010-03-25_1033_PF36\(4\)_w_line_numbers.pdf](http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/2010-03-25_1033_PF36(4)_w_line_numbers.pdf)
58. United States Pharmacopoeia - USP. USP 35: NF 30:5186 <1034> Analysis of biological assays. North Bethesda: United States Pharmacopoeia; 2017[access May 15, 2018]. Available at: [http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/2010-03-25_1034_PF36\(4\)_w_line_numbers.pdf](http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/2010-03-25_1034_PF36(4)_w_line_numbers.pdf)
59. Council of Europe. Statistical analysis of results of biological assays and tests. In: Council of Europe. The european pharmacopoeia. 6th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2007. p. 571-600.
60. US Food and Drug Administration - FDA. Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics: guidance for industry. Washington: U.S. Department of Health and Human Services; 2015[access May 17, 2018]. Available at: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm386366.pdf>
61. Clifford JR. Guidelines for validation of in vitro potency assays. Washington: United State Department of Agriculture; 2015[access May 15, 2018]. Available at: https://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications/memo_800_112.pdf
62. Magnusson B, Örnemark U. Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. Torino: Eurachem; 2014[access Aug 14, 2018]. Available at: <http://www.eurachem.org>
63. Council of Europe. Substitution of in vivo method(s) by in vitro method(s) for the quality control of vaccines. In: Council of Europe. The european pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2018. p. 4737-8.
64. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (BR). Resolução normativa Nº 17, de 3 de julho de 2014. Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências. *Diário Oficial União*. July 4, 2014.
65. Schrock RD. Cell-based potency assays: expectations and realities. *BioProcess J*. 2012;11(3):4-12. <https://doi.org/10.12665/J113.Schrock>
66. Moreira WC, Freitas JFS, Machado NS, Almeida AECC, Moura WC. Development and pre-validation of a quantitative multi-dose serological assay for potency testing of inactivated rabies vaccines for human use. *J Virol Methods*. 2019;263:54-9. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.10.003>
67. Bureau International des Poids et Mesures - BIPM. International vocabulary of metrology: basic and general concepts and associated terms. 3rd ed. Saint-Cloud: Bureau International des Poids et Mesures; 2012[access June 5, 2018]. Available at: https://www.bipm.org/utlis/common/documents/jcgm/JCGM_200_2012.pdf



68. Winsnes R, Sesardic D, Daas A, Rigsby P. A vero cell method for potency testing of diphtheria vaccines. In: Brown F, Hendriksen C, Sesardic D, Cussler K, editors. Advancing science and elimination of the use of laboratory animals for development and control of vaccine and hormones. Basel: Karger; 2002.
69. Council of Europe. Rabies vaccine (inactivated) for veterinary use. In: Council of Europe. The european pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2016. p.1093-5.
70. Council of Europe. Rabies vaccine for human use prepared in cell cultures. In: Council of Europe. The european pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2016. p. 976-1092.
71. Arko RJ, Wiktor TJ, Sikes RK. Laboratory techniques in rabies: the antibody binding test for vaccine potency. Monogr Ser World Health Organ. 1973;(23):292-4.
72. Ferguson M. Single radial immunodiffusion test for the determination of the glycoprotein content of inactivated rabies vaccines. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva: WHO; 1996. p.378-82.
73. Bruckner L, Cussler K, Halder M, Barrat J, Castle P, Duchow K et al. Three rs approaches in the quality control of inactivated rabies vaccines. Altern Anim Exp. 2003;31(4):429-54. <https://doi.org/10.1177/026119290303100409>
74. Council of Europe. Swine erysipelas vaccine (inactivated). In: Council of Europe. The european pharmacopoeia. 8th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2017. p.1018.
75. Rozet E, Ceccato A, Hubert C, Ziemons E, Oprean R, Rudaz S et al. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. J Chromatogr A. 2007;1158(1/2):111-25. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.111>
76. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RE N° 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial União. June 2, 2003.
77. International Organization for Standardization - ISO. ISO 3534-2 Statistics: vocabulary and symbols part 2: applied statistics. 2nd ed. Geneva: International Organization for Standardization; 2006[access Aug 28, 2018]. Available at: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:3534:-2:ed-2:v1:en>
78. International Organization for Standardization - ISO. ISO 5725 Application of the statistics-accuracy (trueness and precision) of the results and methods of measurement part 1: general principles and definitions. Geneva: International Organization for Standardization; 1994.
79. Akobeng AK. Understanding diagnostic tests 1: sensitivity, specificity and predictive values. Acta Paediatr. 2007;96(7):338-41. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2006.00180.x>
80. Blancou J, Artois M, Brochier B, Thomas I, Pastoret PP, Desmettre P et al. Safety and efficacy of an antirabies vaccine consisting of recombinant vaccinia-rabies virus administered orally to the fox, dog and cat. Ann Rech Vet. 1989;20(2):195-204.
81. World Health Organization - WHO. Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs. Geneva: World Health Organization; 2007. p.109-10.
82. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Farmacopeia brasileira volume 2. 5th ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2010.
83. Council of Europe. Biological standardisation programme: background & mission. Paris: Council of Europe; 2018[access Aug 8, 2018]. Available at: <https://www.edqm.eu/en/Biological-Standardisation-Programme-mission-60.html>.
84. Raymond B, Gaillandre A, Gibelin N, Maignan N, Michalski C, Nabet P et al. Guideline for the validation of biological assay methods. STP Pharm Prat. 2005;15(5):364-83.

Agradecimentos

Agradecemos a Ruth Maria Vidotti Kakogiannos, Ph.D. pelo apoio em inglês e ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Incqs - Fiocruz.

Contribuição dos Autores

Moreira WC - Concepção, planejamento (desenho do estudo), aquisição, análise, interpretação dos resultados, redação do trabalho. Machado NS - Aquisição, análise, redação do trabalho. Freitas JFS - Aquisição, análise, redação do trabalho. Almeida AECC - Concepção, análise. Moura WC - Planejamento (desenho do estudo), aquisição, análise, interpretação dos resultados, redação do trabalho. Todos os autores aprovaram a versão final do trabalho.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada. Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.