

## Avaliação da legislação e normas vigentes para bioensaios aplicados em pesquisa clínica: um estudo de caso para comprovação de imunogenicidade de vacinas

### Evaluation of the current legislation and guidance documents applied to bioassays in clinical trials: a case study to prove the vaccines immunogenicity

Ester Ribeiro de Figueiredo  
Sheila Maria Barbosa de Lima  
Priscila da Nobrega Rito  
Erika Martins de Carvalho\*

#### RESUMO

As vacinas são produtos imunobiológicos reconhecidamente seguros, eficazes e fundamentais no controle e/ou erradicação de doenças imunopreveníveis, sendo submetidas a testes analíticos e bioensaios para comprovação da qualidade e eficácia terapêutica. Neste trabalho foi avaliada a aplicabilidade da Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 e analisados os demais documentos de validação de bioensaios preconizados pela *World Health Organization*, *Food and Drug Administration*, *United States Pharmacopeia*, *European Medicines Agency* e literatura científica. A análise dos artigos e dos documentos regulatórios demonstraram diretrizes incongruentes. Esta análise evidencia que é necessária a elaboração de uma legislação pertinente para atender as particularidades dos bioensaios aplicados nas vacinas para comprovação de imunogenicidade. Foi realizado um estudo de caso, aplicando a validação segundo a (Anvisa), RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 para o Teste de Neutralização por Redução de Placa de lise em placas de 96 poços (Micro-PRNT) para sarampo, focando na eficácia dos testes a serem empregados nos estudos de imunogenicidade gerados para o vírus do sarampo após a vacinação. O estudo evidenciou que o método apresenta seletividade e especificidade necessária para aplicabilidade em amostras de soro de indivíduos vacinados com a vacina combinada tríplice ou quádrupla viral.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bioensaios; Controle de Qualidade; Vacinas; Compêndios Oficiais; Legislação Vigente

#### ABSTRACT

Vaccines are immunobiologicals products considered safe, effective and essential to control and / or eradication of vaccine-preventable diseases, and they were submitted to analytical tests and bioassays to check the quality and therapeutic efficacy. In this study was evaluated the applicability of the Executive Director Resolution of the National Health Surveillance Agency, (Anvisa), RDC nº 27 May 17, 2012 and analyzed the other standardized bioassays documents recommended to the World Health Organization, Food and Drug Administration, United States Pharmacopeia, European Medicines Agency and data literature. The analyses of data literature and regulation statutes showed inconsistent guidelines. This study showed that is essential create a more targeted legislation to respond the particularities of bioanalytical assays in clinical trials to ascertain the vaccines immunogenicity. In order to corroborate with this guideline elaboration was carried out a case study by a standardized measles virus plaque reduction neutralization test in a 96-well plates (Micro-PRNT) to measure vaccinia neutralization according to RDC nº 27 May 17, 2012, 27 focus on the effectiveness of tests that is used in vaccine generated immune responses studies. The results showed that the method provides the selectivity and specificity required for applicability in combination vaccines as MMR (mumps, measles and rubella) or MMRV (measles, mumps, rubella and varicella vaccine).

**KEYWORDS:** Bioassays; Quality Control; Vaccines; Official Compendia; Current Legislation

Instituto de Tecnologia em  
Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz  
(Farmanguinhos/Fiocruz), Rio de  
Janeiro, RJ, Brasil

\* E-mail: erikamc@far.fiocruz.br

Recebido: 03 fev 2016  
Aprovado: 17 ago 2016



## INTRODUÇÃO

As vacinas são medicamentos imunobiológicos que contêm uma ou mais substâncias antigênicas que quando inoculadas, são capazes de induzir imunidade específica ativa, a fim de proteger contra, reduzir a severidade ou combater doenças causadas pelo agente que originou o antígeno<sup>1</sup>. Diferem dos produtos químicos farmacêuticos por terem composição molecular complexa, de alto peso molecular, originada de organismos vivos contendo antígenos, adjuvantes, excipientes, conservantes e antibióticos. A variabilidade inerente ao material de partida, dos processos de produção, e a natureza complexa dos próprios produtos requerem um controle de qualidade (CQ) específico e mecanismos de controle de qualidade diferentes dos empregados em produtos químicos farmacêuticos de matriz mais simples, como os medicamentos de origem sintética<sup>2</sup>.

No desenvolvimento das vacinas é necessária a aplicação dos bioensaios para avaliar a resposta imunobiológica e a eficácia desses produtos. A imunogenicidade é a habilidade de uma substância ativar uma resposta ou reação imune, como o desenvolvimento de anticorpos específicos<sup>1</sup>.

Bioensaios são ensaios utilizados na determinação quantitativa de analitos em matrizes biológicas como: soro, sangue e plasma. No caso das vacinas, os bioensaios são utilizados para analisar amostras biológicas oriundas da pesquisa clínica, para a verificação da imunogenicidade e para os demais testes de desempenho. Para avaliar o título de anticorpos neutralizantes, presentes em amostras de soro de indivíduos vacinados ou infectados naturalmente por vírus, é empregado o Teste de Neutralização por Redução de Placa de Lise em placas de 96 poços (Micro-PRNT)<sup>3,4</sup>. O teste de Micro-PRNT é um dos principais pilares para assegurar a imunogenicidade da vacina, considerado o teste referência para a determinação do título de anticorpos neutralizantes<sup>3,4,5,6</sup>. Os níveis de anticorpos neutralizantes determinados em ensaios clínicos e pré-clínicos durante o desenvolvimento de uma vacina servem como correlato de imunogenicidade vacinal. O nível de anticorpos neutralizantes presentes em uma amostra de soro é determinado pela capacidade do soro de um determinado indivíduo impedir a formação de placas de lise em células suscetíveis. Este ensaio baseia-se na reação do vírus infeccioso com o anticorpo específico, formando o complexo antígeno-anticorpo, este complexo formado impede a entrada do vírus em células permissivas impedindo a formação da placa de lise. Na ausência de anticorpos, o vírus não é neutralizado e conseqüentemente consegue se ligar a célula, realiza a replicação viral e forma a lise celular<sup>4</sup>.

Entretanto o Micro-PRNT apresenta uma grande variabilidade nos seus resultados, devido à natureza da matriz biológica analisada (soro). Neste teste também são incluídas como fontes de interferência a amostragem e o preparo da amostra, ou seja, fatores operacionais, sendo essas variações consideradas aceitáveis pelos órgãos reguladores<sup>2</sup>.

Para a aplicação dessa metodologia nas pesquisas clínicas de vacinas é imprescindível que a mesma seja submetida ao processo

de validação bioanalítica para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos e a robustez do estudo<sup>7</sup>.

Cabe ressaltar que, apesar de todo empenho da comunidade científica, observa-se ainda a falta de orientação mais específica e prática sobre a validação de métodos bioanalíticos e testes de potência de vacina. Este fato constitui uma barreira para a implementação, desenvolvimento e aprimoramento de métodos já praticados ou novos, principalmente para os métodos aplicados em pesquisa clínica.

Além disso, o *Food and Drug Administration* (FDA)<sup>8</sup>, a *European Medicines Agency* (EMA)<sup>9</sup> e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa)<sup>10,11</sup> apresentam roteiros de validação priorizando os métodos cromatográficos. Por outro lado, a *United States Pharmacopeia* (USP)<sup>12</sup> e a *World Health Organization* (WHO)<sup>2</sup> possuem roteiros de validação de bioensaios de maneira mais ampla e essencialmente de caráter biológico.

Mediante as diferenças de diretrizes e as novas tendências para o controle de qualidade de medicamentos biológicos e produtos imunobiológicos, este estudo visa discutir e avaliar a pertinência da RDC n° 27, de 17 de maio de 2012<sup>11</sup> - Anvisa, aplicada na pesquisa clínica, para avaliação de imunogenicidade de vacinas virais, e comparar as metodologias utilizadas para a validação de métodos imunobiológicos na literatura científica e órgãos reguladores. Paralelamente, apresenta um estudo de caso de validação do teste de Micro-PRNT para sarampo para ser empregado na avaliação da imunogenicidade da vacina combinada, visando confirmar a aplicabilidade, seletividade e especificidade que este método proporciona.

## MÉTODO

Para avaliação e verificação dos parâmetros e critérios da validação dos bioensaios utilizados em pesquisa clínica pela comunidade acadêmica e industrial, que comprovem a imunogenicidade de vacinas, realizou-se um estudo descritivo, retrospectivo e comparativo entre os guias, compêndios oficiais e legislação vigente sobre o controle de qualidade de vacinas com ênfase nos métodos bioanalíticos. Mais precisamente, as bases deste estudo foram: (WHO)<sup>2</sup>(Suíça), USP<sup>12</sup>(EUA), EMA<sup>9</sup>, FDA<sup>8</sup>(EUA) e Anvisa<sup>1</sup>(Brasil). Paralelamente, foi realizada uma revisão bibliográfica utilizando as bases eletrônicas de dados *Pubmed*, *Medline* e o *SciFinder*, que apresentam as publicações científicas mundiais indexadas pelo *Chemical Abstracts*, sem restrição de tempo, mas priorizando os trabalhos publicados na última década.

Como critérios de inclusão foram utilizadas pesquisas que estivessem diretamente relacionadas com teste de potência, controle de qualidade, pesquisa clínica, vacinas virais, testes sorológicos, Micro-PRNT, animais de laboratório, confiabilidade e precisão.

Posteriormente foi realizado um estudo de caso através da validação do Teste de Micro-PRNT. Foi verificada a pertinência da



RDC n° 27, de 17 de maio de 2012 da Anvisa, e aspectos relevantes dos demais documentos avaliados, com intuito de garantir uma validação da metodologia de maneira robusta e confiável. No desenvolvimento e validação do método foram utilizados os seguintes materiais:

**Soro padrão *in house*:** O soro padrão preparado *in house* utilizado como controle positivo (60/12) foi selecionado entre as amostras de soros doados pela Seção de Caracterização Sorológica, SECAS/Bio-Manguinhos. Este foi calibrado e padronizado frente a um soro de referência internacional do *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC). O soro padrão foi inativado e estocado a -20°C até a realização dos testes.

**Soro negativo:** Soro A15 proveniente de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) usado como controle negativo no Laboratório de Neurovirulência, LANEU/ Bio-Manguinhos.

**Soros amostrais:** Soros (55/12, 54/12, 56/12 e 02/12), utilizados no ensaio, foram provenientes da hemorrede nacional, através do convênio 1.429 da Coordenação Nacional de Política de Sangue e Hemoderivados.

**Meio Diluente para o Micro-PRNT de Sarampo:** Cada 100 ml de meio: 10,0% de meio 199 com sais de Earle (10X); 5,0% de soro fetal bovino inativado, 1,0% de sulfato de gentamicina (4 mg/ml) e 5,0% de bicarbonato (4,4%).

A cepa viral Schwarz lote Vero 3ª passagem (P3), produzida em 25/01/11 foi utilizada para o processamento dos testes. No momento do uso, uma alíquota viral (mantida a -70°C) foi descongelada rapidamente em água corrente e procedeu-se com a diluição viral (em meio diluente para o Micro-PRNT) na concentração necessária para a obtenção de uma média de 30 placas de lise por orifício (determinada previamente por titulação viral).

Células Vero, uma linhagem de rim de macaco verde africano (ATCC, CCL 81), expandidas a partir do banco de células, foram mantidas em meio 199 com sais de Earle (10X), tamponado com bicarbonato de sódio gaseificado (4,4%), suplementado com soro fetal bovino inativado e antibiótico. No momento do uso, uma suspensão celular foi preparada (em meio diluente para o Micro-PRNT) na concentração de  $1,6 \times 10^6$  células/mL.

O método de Micro-PRNT de Sarampo foi validado segundo a RDC n° 27, de 17 de maio de 2012 da Anvisa.

**Curva de calibração:** Diluição seriada (1:2-1:4096/fator 2 de diluição) do padrão positivo *in house* 60/12, concentração de 3.981 mUI, onde cada diluição foi testada em sextuplicata e realizado por um único operador em 3 (três) dias consecutivos. Após esta etapa de diluições seriadas do soro, 50 µL da suspensão viral foram distribuídos em todos os poços das placas. A coluna 12 de cada placa foi destinada ao controle de vírus; ou seja, somente o vírus diluído em meio diluente para Micro-PRNT. Para a etapa de neutralização, as misturas contendo vírus e soro foram incubadas por 2 horas na estufa com 5,0% CO<sub>2</sub> a 37°C. Após essa incubação, 50 µL de uma suspensão

de células foram adicionados a cada orifício da placa e esta foi incubada novamente por 3 horas a 37°C em estufa com 5,0% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, o sobrenadante foi completamente removido e adicionou-se 100 µL de meio semissólido com Carboximetilcelulose 3,0% (CMC) em todos os orifícios da placa. Finalmente, as monocamadas foram incubadas por sete dias a 37°C em incubadora com 5,0% de CO<sub>2</sub>.

Após os sete dias, as monocamadas foram fixadas com 0,2 mL de formol (10,0%) por, pelo menos, 1 hora à temperatura ambiente. O formol foi retirado por inversão vigorosa das placas, seguida de lavagem das monocamadas formadas em uma cuba com água corrente até a completa remoção do CMC. Em seguida, foram colocados 100 µL do corante cristal violeta (0,04%) em todos os orifícios da placa, que permaneceu por 30 minutos em temperatura ambiente. Após fixadas, coradas e secas, as placas de lise formadas foram fotografadas e contadas no *BioSpot* (CTL).

**Cálculos do Título de Anticorpos Neutralizantes:** Primeiramente calcula-se o *end-point* do teste, que é o ponto onde há uma redução de 50,0% do número das placas de lise em relação ao número de plaques obtidos no controle de vírus. Assim, o título do Micro-PRNT é definido como a recíproca da última diluição do soro que reduz o número de placas de lise em 50,0%. O *end-point* de 50,0% do teste foi determinado multiplicando-se a média aritmética do número de placas de lise obtidas no controle de vírus por 0,5. A diluição do soro amostral que reduziu o número de placas de lise em 50,0% foi calculada através de regressão linear utilizando o Microsoft Excel 2007, por interpolação das diluições correspondentes ao número de plaques imediatamente acima e abaixo do *end-point* determinado. A concentração de anticorpos em mUI/mL foi calculada com relação aos anticorpos presentes no soro *in house*, da seguinte forma: o quociente (o qual chamamos de constante) da divisão de 3.090 mUI/mL pela sua diluição correspondente ao *end-point* é multiplicado pela diluição do soro amostral equivalente ao *end-point* determinado para o teste. O *baseline* foi calculado na menor diluição dos soros (1:5), pois corresponde ao limite de detecção do teste.

### Análises Estatísticas

Os resultados obtidos do Micro-PRNT foram organizados no Microsoft Excel 2007. As análises estatísticas (gráficos de dispersão e o Coeficiente de Correlação) foram realizadas no *Statistical Package for Social Science V.17.0*<sup>13</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após estudo retrospectivo e comparativo no banco de dados eletrônicos da Anvisa, das legislações vigentes, dos guias e dos compêndios ligados ao tema, verificou-se que há um consenso nos diversos órgãos e agências reguladoras (Esquema). Que os métodos bioanalíticos ou bioensaios, que englobam os ensaios imunológicos e sorológicos precisam ser validados para atestar a confiabilidade e comprovar que podem ser utilizados em substituição aos métodos empregando animais, no CQ rotineiro. Estes ensaios apresentam uma grande variabilidade nos seus



resultados devido à natureza das matrizes, da particularidade do sistema imunológico, dos fatores operacionais como fonte de interferência, da amostragem e do preparo da amostra<sup>1,8,9,10</sup>.

No Brasil, a quinta edição da Farmacopeia Brasileira<sup>10</sup> deve ser utilizada como referência para testes e ensaios, muito embora não contemple os métodos bioanalíticos. Portanto, faz-se necessária a utilização de outros compêndios oficiais. Cabe ressaltar que os guias são documentos que sugerem uma linha de trabalho a ser seguida e são abertos a discussões e interpretações, podendo ser analisadas e adaptadas conforme o método a ser validado. Por outro lado, as resoluções são documentos com poder de lei e devem ser seguidas à risca, obrigatoriamente.

Para a validação de um procedimento analítico, vários parâmetros devem ser analisados<sup>10,14</sup> com destaque para: exatidão, precisão, reprodutibilidade, linearidade, especificidade, limites de quantificação e detecção, podendo ou não ser incluído o teste de robustez. Entretanto, os guias e resoluções apresentam diferentes diretrizes dignas de destaque e de ponderação em relação aos parâmetros de validação de bioensaios (Quadro 1) que podem ocasionar diferentes interpretações.

Abaixo seguem as principais características de cada documento destacando os respectivos pontos negativos e positivos:

#### 1) WHO - Guia de Boas Práticas de Fabricação<sup>2</sup> (BPF) Parte 2: Validação, 1997.

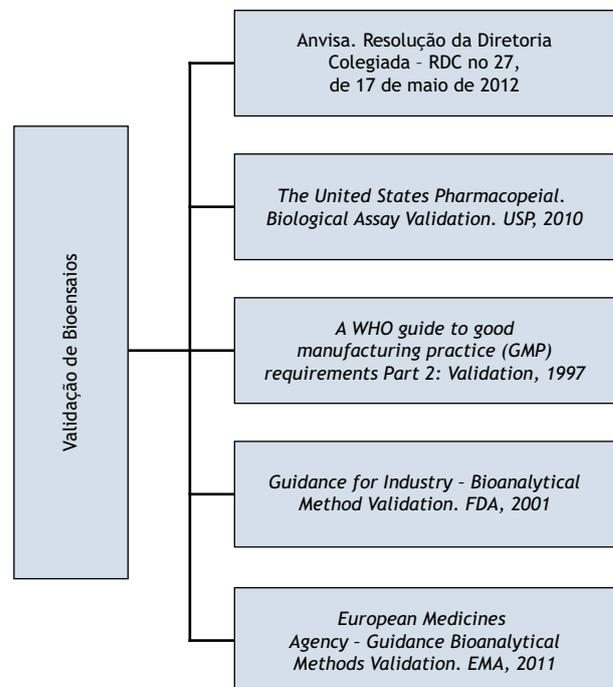
O guia apresenta abordagens relevantes, que não são citadas em outros documentos referentes a este tipo de validação, como:

1. A classificação dos bioensaios em três grandes categorias: ensaios de ligação, em células e em animais. Estas categorias são caracterizadas e diferenciadas pelas aplicações, dificuldades, parâmetros de validação e critérios de aceitação. Assim, em cada teste são consideradas as possíveis causas de variações, direcionando o estudo de validação de maneira específica, selecionando os parâmetros pertinentes para confirmar que a metodologia está de acordo com o uso pretendido.
2. Os critérios de aceitação dos bioensaios são os que mais apresentam variações: ensaios de ligação com coeficiente de variação (CV) de 5,0% a 20,0% e ensaios em células e em

animais com CV que pode ser de até 50,0%. Já os outros documentos não levam em consideração as variações inerentes aos bioensaios e apresentam critérios de aceitação apropriados para métodos físico-químicos ou microbiológicos, podendo acarretar dificuldades na avaliação dos resultados do estudo da validação.

Contudo, o desenho de validação do guia requer o preparo de um número expressivo de amostras teste e amostra padrão, em diversas diluições, para mimetizar concentrações distintas, faltando uma abordagem com foco mais biológico. Cabe ressaltar que a validação de ensaios biológicos enfrenta um grande limitante referente ao volume de soro empregado para realização dos testes preconizados na validação. O volume necessário muitas vezes supera o disponível nos laboratórios. Outro fator relevante é a falta de material de referência para comparar com o material testado.

#### 2) FDA - Guia para Indústria - Validação de Métodos Bioanalíticos, 2001<sup>8</sup>



Esquema. Principais guias e compêndios oficiais para uso e validação de métodos bioanalíticos.

Quadro 1. Parâmetros de validação para bioensaios utilizados pelas agências reguladoras.

| OMS, 1997               | FDA, 2001           | USP, 2010      | EMA, 2011                        | ANVISA, 2012        |
|-------------------------|---------------------|----------------|----------------------------------|---------------------|
| Precisão                | Precisão            | Precisão       | Precisão                         | Precisão            |
| Exatidão                | Exatidão            | Exatidão       | Exatidão                         | Exatidão            |
| Seletividade            | Seletividade        | Especificidade | Seletividade                     | Seletividade        |
| Intervalo               | Recuperação         | Intervalo      | Curva de calibração              | Curva de calibração |
| Linearidade             | Curva de calibração | -              | Estabilidade                     | Estabilidade        |
| Limite de detecção      | Estabilidade        | -              | Efeito residual                  | Efeito residual     |
| Limite de quantificação | -                   | -              | Efeito matriz                    | Efeito matriz       |
| Robustez                | -                   | -              | Limite inferior de Quantificação | -                   |



O guia recomenda que o desenvolvimento do método bioanalítico ocorra simultaneamente com a sua respectiva validação, especificando os seguintes ensaios:

#### 1. Ensaio físico-químico em matriz biológica

O documento descreve que os bioensaios devem ser seletivos e sensíveis para a avaliação quantitativa de fármacos e seus metabólitos, para a realização da pesquisa pré-clínica ou clínica. Orienta para a validação de bioensaios utilizados em farmacologia, biodisponibilidade, bioequivalência e farmacocinética aplicando geralmente procedimentos que utilizam cromatografia e espectrometria de massa para a determinação quantitativa de drogas e ou metabólitos em matrizes biológicas, como sangue, plasma, soro ou urina. Também é aplicado em ensaios imunológicos e em outras matrizes biológicas como tecidos e amostra de pele.

#### 2. Ensaios microbiológicos e ensaios de ligação

O guia menciona que esses ensaios possuem características únicas, e apresentam uma alta variabilidade e possíveis interferências ligadas à reatividade cruzada de metabólitos, medicamentos concomitantes, e outros. Quando possível, estes ensaios devem ser comparados com um método validado de referência, como métodos cromatográficos, espectrofotometria ou espectrometria de massa, utilizando as mesmas amostras para comparar os testes de precisão.

Os pontos mais relevantes e positivos neste guia são o detalhamento dos parâmetros de validação e seus respectivos critérios de aceitação para os bioensaios com característica química, microbiológica e ensaios de ligação, com prioridade as metodologias instrumentais como, por exemplo, a cromatografia.

Os pontos negativos estão relacionados à priorização das metodologias instrumentais, o que acarreta em um desenho de validação muito direcionado a questão química em detrimento dos biológicos, como os ensaios de neutralização, de inibição da hemaglutinação e imunofluorescência, que são ensaios mais relevantes na avaliação da resposta imunobiológica. Outro fato digno de menção refere-se aos bioensaios que não são classificados em qualitativo ou quantitativo, conforme o guia da WHO. Neste caso, o analista precisa selecionar os parâmetros de validação de forma pertinente, previamente. Os critérios de aceitação recomendados também não são pertinentes para ensaios *in vivo* e ensaios de ligação ( $CV \pm 20,0\%$ ), que é um valor baixo e não representa a realidade desses tipos de ensaios. O quantitativo para a realização dos testes (amostras e replicatas da curva de calibração) também é muito alto, inviável para a pesquisa clínica.

O guia encontra-se em revisão desde setembro de 2013, e está disponível para consulta pública, com objetivo de verificar os avanços da ciência e tecnologia relacionados à validação de bioensaios. Os pontos de discussão mais relevantes são o aumento do critério de aceitação para os parâmetros da validação: - CV de até 20,0% para a CV até 25,0% para o

limite inferior de quantificação (LIQ) e CV de até 15,0% para CV de até 20,0% para as demais concentrações, a inclusão no guia dos compostos endógenos, dos biomarcadores, de kits para diagnóstico e informações mais detalhadas sobre métodos cromatográficos.

#### 3) USP - Validação de Ensaios Biológicos, 2010<sup>12</sup>

Este compêndio oficial define bioensaios como métodos para determinar a potência do insumo farmacêutico ativo (IFA) de matriz biológica que podem ser utilizados para mensurar uma resposta bioquímica ou fisiológica no nível celular, as taxas de reação enzimática ou respostas biológicas induzidas por interações imunobiológicas e que também possam contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos de origem biológica.

O documento destaca que a validação de bioensaios deve ser diferenciada da validação analítica, por apresentar uma maior variabilidade que os métodos químicos devido aos fatores operacionais e biológicos.

Enfatiza abordagens de validação que fornecem flexibilidade para adoção de novos bioensaios e que a avaliação do desempenho do bioensaio é um processo contínuo, mas a validação da metodologia deve ser realizada após o desenvolvimento do método.

A validação de bioensaios tem como referência o teste de potência, sendo este teste baseado na comparação das respostas de uma amostra e um padrão de referência, onde o padrão é atribuído o valor 1 ou 100,0%, e a potência é calculada por comparação.

Este compêndio oficial apresenta como ponto forte a descrição de uma validação bem delineada para os ensaios de potência. Os parâmetros de validação são direcionados de forma coerente e de fácil aplicabilidade, facilitando uma boa interpretação dos dados resultantes e uma conclusão bem delineada.

Em relação aos pontos fracos, o documento descreve apenas o teste de potência como bioensaio e, na realidade, existem outros tipos, como ensaios de ligação e ensaios *in vivo*, tornando-se limitado e sendo de difícil aplicação para os demais tipos de bioensaios. Também não apresenta o quantitativo dos parâmetros de validação, com exceção do teste de precisão e os critérios de aceitação não são relatados.

#### 4) EMA - Agência Europeia de Medicamentos - Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos, 2011<sup>9</sup>.

Este guia define elementos necessários para a validação de bioensaios com característica quantitativa, ou seja, mensura a concentração de um determinado IFA em uma dada matriz biológica. Eles são utilizados para determinações de parâmetros nos estudos farmacocinéticos e toxicológicos. Assim, a determinação das concentrações das drogas em matrizes biológicas (soro, plasma, sangue, urina e saliva) é importante para o desenvolvimento de um medicamento.



O capítulo sobre os ensaios de ligação pode ser considerado como ponto forte do guia, pois apresenta uma abordagem separada e detalhada sobre este assunto. É relatado que o ensaio é empregado especialmente em macromoléculas, que apresentam muitos desafios devido às suas características inerentes e estruturas complexas. Assim, é necessária uma atenção especial em todas as etapas do ensaio, como por exemplo, o processo de extração do analito na matriz biológica.

A EMA também descreve os desafios relacionados aos padrões de referência destes ensaios. As macromoléculas apresentam características heterogêneas, e sua potência e imunorreatividade podem variar, sendo necessária uma caracterização bem detalhada e robusta do padrão. É recomendado que os lotes do padrão de referência, empregado para a preparação de padrões de calibração, e das amostras de CQ sejam os mesmos que os utilizados para a dosagem nos estudos clínicos e não clínicos. No caso de mudança de lote, uma caracterização analítica e uma avaliação bioanalítica devem ser realizadas antes da utilização para assegurar que as características de desempenho do método não sejam alteradas.

O paralelismo como ferramenta para detectar o efeito matriz e o uso de *kits* comerciais como suporte de testes farmacocinéticos podem ser utilizados, segundo o guia. Esta informação é muito aplicada nos ensaios utilizados em pesquisa clínica.

Os critérios de aceitação apresentados neste guia juntamente com o guia da WHO de 1997<sup>2</sup>, são os que mais chegam próximos a realidade de um ensaio de ligação, pois citam as possíveis causas de interferências e aceitam que estas interferências não comprometem a confiabilidade dos resultados encontrados.

5) Anvisa - Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Guia de validação de métodos bioanalíticos<sup>11</sup>

No Brasil, a Anvisa regulamenta a validação de métodos bioanalíticos através da Resolução - RDC nº 27, de 17 de maio de 2012, na qual são descritos os requisitos mínimos para serem utilizados em estudos para registro e pós-registro de medicamentos no Brasil.

Entretanto, esta RDC apresenta uma abordagem pouco direcionada aos bioensaios, como os ensaios de ligação. Os parâmetros de validação apresentam características direcionadas para métodos bioanalíticos com foco na determinação quantitativa de analitos em matrizes biológicas e métodos cromatográficos para separar o analito de outros componentes da amostra e quantificá-lo. Para os bioensaios, sugere metodologia físico-química, como os ensaios cromatográficos, havendo uma insuficiência de informações para a avaliação do desempenho da metodologia para os demais bioensaios.

O roteiro dos testes de validação é rígido e não específico. Os parâmetros efeito residual e efeito matriz são pertinentes a ensaios cromatográficos e não são passíveis de execução nos ensaios de ligação.

A principal deficiência desta legislação envolve os ensaios de ligação, essenciais para a comprovação da imunogenicidade de vacinas.

#### 6) Controle de Qualidade das vacinas

Embora em muitos artigos e em documentos de orientações oficiais existam discussões sobre procedimentos de CQ propondo testes para conferirem a capacidade das vacinas em gerar imunidade protetora, há uma necessidade de revisão e aprimoramento dos compêndios e guias em relação à validação bioanalítica pertinentes a esses testes, garantindo assim a comprovação da finalidade pretendida dos testes, assegurando a confiabilidade dos dados obtidos, como por exemplo, o estudo da imunogenicidade vacinal. Principalmente, adotando a tendência mundial e o progresso científico que utilizam testes *in vitro* para avaliar determinados parâmetros imunológicos em substituição aos modelos *in vivo*<sup>15</sup>.

O teste de potência também é fundamental para comprovar a eficácia clínica de vacinas individuais ou combinadas. Diferentes métodos de ensaio, tais como, ensaios de propriedades físico-químicas, antigenicidade, infectividade e proteção contra a infecção ou doença são utilizados para medir a potência<sup>16</sup>. A sua aplicação depende da natureza dos antígenos da vacina e do objetivo do ensaio. Os tipos gerais de testes de potência<sup>17</sup> utilizados pelos fabricantes de vacinas incluem: (1) a titulação de organismos vivos (*in vitro*, mas ocasionalmente *in vivo*); (2) ensaios *in vitro* tais como ensaios de imunoabsorção ligados à enzima (ELISA) ou outros métodos de quantificação de antígeno; (3) Métodos *in vivo* que envolvem a imunização de animais pequenos de laboratório (como por exemplo, porquinhos da índia, ratos e camundongos), seguido por testes de desafio com toxina/vírus ou bactérias/titulação de soros imunes para medir a resposta de anticorpos<sup>18</sup>.

Os ensaios físico-químicos<sup>19</sup> e de anti genicidade podem ser utilizados de forma independentes ou em paralelo para controlar o fabrico e a consistência da formulação da vacina, mas a correlação destes ensaios com a eficácia protetora é muitas vezes difícil de estabelecer.

Sem dúvida, os ensaios de neutralização de redução de placas (*Plaque Reduction Neutralization Test* - PRNT), de inibição da hemaglutinação (IH), de imunofluorescência indireta (IFA) e ensaio imunoenzimático (ELISA) são os mais valiosos para verificar e comprovar a eficácia da vacina e para diagnosticar pacientes doentes. Há, porém, um consenso da comunidade científica que o Micro-PRNT é o método mais seguro (método de ouro) sendo amplamente utilizado no CQ de vacinas virais, como de febre amarela, rubéola, caxumba, sarampo e varíola considerado, inclusive, um método específico podendo ser utilizado no CQ de vacinas combinadas<sup>4,6,20,21,22,23</sup>. A aplicação do uso do Micro-PRNT no processo de CQ depende da validação bioanalítica. A validação inclui uma avaliação completa da adequação do método para a sua finalidade e uma avaliação completa de uma série de parâmetros de ensaio. Realização de estudos de validação no início do ciclo de vida de desenvolvimento de produto pode ajudar a



estabelecer a coerência entre os lotes utilizados em ensaios de eficácia e lotes de produção reais. Para testes de potência, os parâmetros críticos de ensaio incluem a exatidão, precisão, linearidade, intervalo, especificidade, e robustez, de acordo com a WHO e Conferência Internacional sobre as orientações de harmonização (ICH)<sup>24</sup>. Além disso, as justificações científicas e estatísticas são necessárias para definir as especificações adequadas para a liberação pelo CQ e de produtos. Outro ponto importante é que quando testes de potência de componentes individuais já estão aprovados para uso em produtos licenciados, é necessário mostrar que eles ainda produzem informações válidas quando aplicados a uma vacina combinada.

Nesse novo guia para bioensaios em pesquisa clínica, propõe-se que devam ser contemplados:

- Desenhos experimentais de validação adequados aos diversos tipos de bioensaios;
- Critérios de aceitação que levem em consideração a variabilidade dos bioensaios;
- Padronização dos resultados, como a transformação em escala logarítmica.

#### Estudo de Caso: Validação do teste de Micro-PRNT para sarampo e avaliação da imunogenicidade da vacina combinada

Para o desenvolvimento deste estudo foram considerados os parâmetros de validação e os respectivos critérios de aceitação preconizados pela RDC n° 27, de 17 de maio de 2012 da Anvisa (curva de calibração, exatidão, precisão e seletividade) e incluído o LIQ com o objetivo de verificar a sensibilidade do método. Porém devido às características do teste de neutralização, os parâmetros efeito matriz e o efeito residual foram excluídos por ser tratar de um método manual<sup>25</sup>. Cabe ressaltar que a WHO, a EMA, o FDA e a USP não incluem estes parâmetros específicos para este bioensaio em seus documentos.

Neste estudo, as amostras teste foram submetidas à diluição seriada em uma placa de 96 poços segundo metodologias descritas na literatura<sup>26,27,28</sup>. O primeiro ensaio consistiu na construção da curva de calibração através de uma diluição seriada (1:2-1:4.096/fator 2 de diluição) do padrão positivo *in house* 60/12, concentração de 3.981 mUL, na qual cada diluição foi testada em sextuplicata e os ensaios realizados por um único operador em três dias consecutivos.

Conceitualmente, a curva de calibração tem por objetivo representar a relação entre a resposta de um determinado instrumento com a concentração conhecida do analito. Nesta metodologia em questão foi avaliada a capacidade do ensaio em detectar concentrações distintas do analito e definir a faixa de diluição.

A partir deste ensaio, foram definidas as concentrações de anticorpos necessárias para a validação do teste:

1. Limite inferior de quantificação (LIQ): menor concentração do analito na curva de calibração preparada na matriz;

2. Amostra de controle de qualidade de baixa concentração (CQB): amostra de matriz adicionada do analito em concentração até três vezes o LIQ do método;
3. Amostra de controle de qualidade de média concentração (CQM): amostra de matriz adicionada do analito em concentração próxima à média entre os limites inferior e superior de quantificação;
4. Amostra de controle de qualidade de alta concentração (CQA): amostra de matriz adicionada do analito em concentração entre 75,0% (setenta e cinco) e 85,0% (oitenta e cinco por cento) da maior concentração da curva de calibração; e;
5. Amostra de controle de qualidade de diluição (CQD): amostra de matriz adicionada do analito em concentração acima da maior concentração da curva de calibração.

O título de anticorpos neutralizantes foi definido como a recíproca da última diluição do soro que reduz o número de placas de lise em 50,0% em relação ao número de placas de lise obtidas no controle viral<sup>21</sup>.

A curva de calibração definiu as concentrações de anticorpos necessárias para a validação do teste, no qual anticorpos com título na recíproca da diluição de 1:5 seriam considerados como LIQ, 1:15 como CQB, 1:100 como CQM, 1:300 como CQA e como 1:640 CQB.

A determinação dos títulos foi calculada por regressão linear e o resultado dado em  $\log_{10}$  mUI/mL. Esta operação foi adotada seguindo recomendação da USP visando proporcionar a uniformização dos dados que não apresentam um comportamento linear, decorrente do tipo de metodologia. Do ponto de vista estatístico, qualquer transformação que corrija as variações intrínsecas da metodologia, permitindo a conformidade dos resultados é aceitável<sup>13</sup>.

O parâmetro de precisão intra e intercorrida foi realizado em cinco réplicas de cada uma das concentrações e os resultados estão dentro do critério de aceitação quando apresentados em log (Quadro 2).

A RDC n° 27, de 17 de maio de 2012 da Anvisa solicita que para análise de exatidão seja realizado o cálculo de CV% para cada concentração estipulada na curva de calibração. Porém, a RE n° 899, de 29 de maio de 2003 da Anvisa<sup>29</sup> é mais adequada a metodologia empregada. O cálculo é realizado por meio da correção da diluição de cada concentração e comparado com o valor nominal do padrão *in house*. A exatidão média foi de 102,3%, comprovando que o bioensaio quantifica os anticorpos neutralizantes para o vírus sarampo de maneira satisfatória. Neste caso, a variação permitida para o parâmetro de exatidão é de  $\pm 15\%$ , ou seja, 85,0% a 115,0%.

A sensibilidade do teste é representada pelo LIQ, que, no caso do Micro-PRNT, representa a menor diluição da amostra capaz de neutralizar o vírus desafio. É importante ressaltar que a sensibilidade do teste está abaixo do ponto de corte (1/25), demonstrando que as diluições são adequadas para a realização do estudo clínico, e asseguram a classificação de positividade ou negatividade do soro<sup>30</sup>.

Para vacinas combinadas, como a tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola), as amostras de soro de pacientes imunizados apresentarão



Quadro 2. Sumários dos parâmetros de precisão intra e intercorrida\*.

| Precisão intracorrida        |                         |                         |                         |                         |                         |
|------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                              | Log <sub>10</sub> (LIQ) | Log <sub>10</sub> (CQB) | Log <sub>10</sub> (CQM) | Log <sub>10</sub> (CQA) | Log <sub>10</sub> (CQD) |
| Coefficiente de variação (%) | --                      | 5,20                    | 4,93                    | 4,03                    | 0,90                    |
| Precisão intercorrida        |                         |                         |                         |                         |                         |
|                              | Log <sub>10</sub> (LIQ) | Log <sub>10</sub> (CQB) | Log <sub>10</sub> (CQM) | Log <sub>10</sub> (CQA) | Log <sub>10</sub> (CQD) |
| Coefficiente de variação (%) | --                      | 4,55                    | 4,11                    | 3,77                    | 2,22                    |

\*Critério de aceitação: CV ≤ 20,0% em relação à concentração nominal para os padrões de LIQ e desvio ≤ 15,0% para as demais concentrações.

anticorpos para os três vírus. É de suma importância que o Micro-PRNT apresente seletividade para o vírus em estudo. Para este parâmetro, o experimento foi realizado com as seguintes amostras: controle positivo sarampo (padrão *in house* 60/12), controle negativo sarampo (A15), amostra positiva caxumba (SIH142 - amostra humana obtida no estudo "soro *in house*"), controle negativo caxumba (AA61), e todas as amostras foram aplicadas em triplicata. A análise dos dados demonstrou que o Micro-PRNT para sarampo foi seletivo para o anticorpo de sarampo e não houve reação cruzada com o anticorpo de caxumba. O resultado comprovou que o teste quantifica inequivocamente o anticorpo de interesse, confirmando os resultados da imunogenicidade produzida pela vacina.

## CONCLUSÕES

São visualmente claras as diferenças entre as diretrizes dos diversos órgãos e legislações relativos ao CQ de vacinas. Como, também, a falta de um roteiro uniforme e específico para bioensaios utilizados na verificação de imunogenicidade.

No caso da RDC n°27, de 17 de maio de 2012 da Anvisa, que é a legislação mandatória no Brasil, sugere-se uma adaptação do conteúdo para validação de métodos bioanalíticos, contemplando testes mais aplicáveis à realidade e às características inerentes de imunológicos. Neste contexto, deveriam ser incluídas, além das metodologias físico-químicas, testes mais específicos voltados para os estudos do caráter biológico de vacinas como os ensaios sorológicos e imunológicos.

Nesta reavaliação, deveriam ser incluídos os ensaios de Micro-PRNT, IH, IFA e ELISA. Entretanto, cada parâmetro requerido

tradicionalmente na validação de métodos analíticos deve ser cautelosamente examinado para verificação da aplicabilidade e critério de aceitação garantindo uma validação robusta e aplicável aos métodos bioanalíticos. Outro fator que deveria ser incorporado é o emprego de CV, com variações de até três vezes entre as replicatas e não em porcentagem, e como critério de aceitação para o teste, que 90,0% das replicatas estivessem dentro desta faixa de variação. A curva de calibração, que é exigida na RDC, não se aplica ao Micro-PRNT, uma vez que conceitualmente uma curva de calibração tem por objetivo representar a relação entre a resposta de um determinado instrumento com a concentração conhecida do analito. No Micro-PRNT não há leitura em equipamento e a curva não é utilizada no ensaio, uma vez que, cada soro sofre uma diluição seriada e, portanto, já representa uma curva. Outra questão é a ausência para alguns ensaios de Micro-PRNT de um soro de referência internacional para construção da curva ou mesmo de uma concentração baixa desses soros, como no caso, dos soros de referência internacional (NIBSC) para dengue.

Este estudo traz, como reflexão final, a necessidade urgente da elaboração de um novo guia ou legislação que apresente uma diretriz de validação específica para bioensaios utilizados em pesquisa clínica que quantifiquem a produção de anticorpos pós-vacinação para a determinação de imunogenicidade, bem como os de mais bioensaios provenientes de analitos biológicos em amostras biológicas.

Concluindo, este trabalho deixa clara a importância da elaboração de um guia, ou legislação, específico a bioensaios para assegurar com propriedade que os produtos imunobiológicos cheguem ao cidadão brasileiro com mais qualidade, segurança e eficácia.

## REFERÊNCIAS

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RDC nº 55, de 16 de junho de 2010. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. Diário Oficial União. 16 jun 2010.
2. World Health Organization - WHO, Global Programme for Vaccines and Immunization, Vaccine Supply and Quality. Good manufacturing requirements. Part 2: validation. Geneva: World Health Organization; 1997.
3. Roehrig JT, Hombach J, Barrett AD. Guidelines for plaque-reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. *Viral Immunol.* 2008;21(2):123-32. doi:10.1089/vim.2008.0007
4. Simões M, Camacho LA, Yamamura AM, Miranda EH, Cajaraville AC, Silva Freire M. Evaluation of accuracy and reliability of the plaque reduction neutralization test (micro-PRNT) in detection of yellow fever virus antibodies. *Biologicals.* 2012;40(6):399-404. doi:10.1016/j.biologicals.2012.09.005
5. Madrid AT, Porterfield JS. A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bull World Health Organ.* 1969;40(1):113-21.
6. Niedrig M, Lademann M, Emmerich P, Lafrenz M. Assessment of IgG antibodies against yellow fever virus after vaccination with 17D by different assays: neutralization test, haemagglutination inhibition test, immunofluorescence assay and ELISA. *Trop Med Int Health.* 1999;4(12):867-71. doi:10.1046/j.1365-3156.1999.00496.x



7. World Health Organization - WHO. Regulation and quality control of vaccines. Geneva: World Health Organization; 2011[acesso 10 abr 2014]. Disponível em [http://www.who.int/biologicals/vaccines/regulation\\_and\\_quality\\_control/\\_vaccines/en/](http://www.who.int/biologicals/vaccines/regulation_and_quality_control/_vaccines/en/)
8. Food and Drug Administration - FDA. Guidance for Industry: bioanalytical method validation. Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services; 2001[acesso 10 abr 2014]. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>
9. European Medicines Agency - EMA. Guideline on bioanalytical method validation. London: European Medicines Agency; 2011[acesso 17 abr 2014]. Disponível em: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf)
10. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Farmacopéia brasileira. 5a ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2010.
11. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Diário Oficial União. 22 maio 2012.
12. United States Pharmacopeia - USP. Biological assay validation. Rockville: United States Pharmacopeia; 2010[acesso 10 abr 2014]. Disponível em: [http://www.ipqpubs.com/wp-content/uploads/2010/06/USP\\_1033.pdf](http://www.ipqpubs.com/wp-content/uploads/2010/06/USP_1033.pdf)
13. SPSS Inc. SPSS Reference guide. Chicago: SPSS Inc; 1990.
14. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - Inmetro, Coordenação Geral de Acreditação. DOQ-CFCRE-008: orientação sobre validação de métodos analíticos: documento de caráter orientativo: revisão 3. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia; 2010.
15. Doke SK, Dhawale SC. Alternatives to animal testing: a review. Saudi Pharm J. 2015;23(3):223-9. doi:10.1016/j.jsps.2013.11.002
16. Taffs RE. Potency tests of combination vaccines. Clin Infect Dis. 2001;33(Suppl 4):S362-6. doi:10.1086/322574
17. Lima CGRD, Lobato ZIP, Pires PS, Silva ROS, Salvarani FM, Assis RA, Lobato FCF. Padronização de teste de potência in vitro para vacinas que contenham toxoide alfa de *Clostridium novyi* tipo B. Arq Inst Biol. 2011;78(4):507-12.
18. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Quim Nova. 2004;27(5):771-80. doi:10.1590/S0100-40422004000500017
19. McFarland R, Verthelyi D, Casey W, Arciniega J, Isbrucker R, Schmitt M et al. Non-animal replacement methods for human vaccine potency testing: state of the science and future directions. Procedia Vaccinol. 2011;5(5):16-32. doi:10.1016/j.provac.2011.10.002
20. Mauldin J, Carbone K, Hsu H, Yolken R, Rubin S. Mumps virus-specific antibody titers from pre-vaccine era sera: comparison of the plaque reduction neutralization assay and enzyme immunoassays. J Clin Microbiol. 2005;43(9):4847-51. doi:10.1128/JCM.43.9.4847-4851.2005
21. Cohen BJ, Doblaz D, Andrews N. Comparison of plaque reduction neutralisation test (PRNT) and measles virus-specific IgG ELISA for assessing immunogenicity of measles vaccination. Vaccine. 2008;26(50):6392-7. doi:10.1016/j.vaccine.2008.08.074
22. Damon IK, Davidson WB, Hughes CM, Olson VA, Smith SK, Holman RC et al. Evaluation of smallpox vaccines using variola neutralization. J Gen Virol. 2009;90:1962-6. doi:10.1099/vir.0.010553-0
23. Matsubara K, Fujino M, Takeuchi K, Iwata S, Nakayama T. A new method for the detection of neutralizing antibodies against mumps virus. PLoS One. 2013;8(7):e65281. doi:10.1371/journal.pone.0065281
24. International Conference on Harmonisation. Guideline on validation of analytical procedures: definitions and terminology. Fed Regist. 1995;60:11259-62.
25. International Conference on Harmonisation. ICH Topic Q2 (R1): validation of analytical procedures: text and methodology. Geneva: International Conference on Harmonisation; 1995.
26. Hughes CM, Newman FK, Davidson WB, Olson VA, Smith SK, Holman RC et al. Analysis of variola and vaccinia virus neutralization assays for smallpox vaccines. Clin Vaccine Immunol. 2012;19(7):1116-8. doi:10.1128/CI.00056-12
27. Fujino M, Yoshida N, Kimura K, Zhou J, Motegi Y, Komase K et al. Development of a new neutralization test for measles virus. J Virol Methods. 2007;142(1-2):15-20. doi:10.1016/j.jviromet.2007.01.001
28. Cohen BJ, Audet S, Andrews N, Beeler J. Plaque reduction neutralization test for measles antibodies: description of a standardised laboratory method for use in immunogenicity studies of aerosol vaccination. Vaccine. 2007;26(1):59-66. doi:10.1016/j.vaccine.2007.10.046
29. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial União. 2 jun 2003.
30. Timiryasova TM, Bonaparte MI, Luo P, Zedar R, Hu BT, Hildreth SW. Optimization and validation of a plaque reduction neutralization test for the detection of neutralizing antibodies to four serotypes of dengue virus used in support of dengue vaccine development. Am J Trop Med Hyg. 2013;88(5):962-70. doi:10.4269/ajtmh.12-0461

#### 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](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR).