Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação — REASE

doi.org/10.51891/rease.v12i11.30773

ELISA E TOBI MODIFICADO PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE PROCESSOS DE VACINAS VIRAIS: UMA REVISÃO INTEGRATIVA DA LITERATURA

ELISA AND MODIFIED TOBI FOR QUALITY CONTROL OF VIRAL VACCINE PROCESSES: AN INTEGRATIVE LITERATURE REVIEW

Gabriela Monteiro Habl[1]
Lúcia Emília Figueiredo de Sousa Rebello[2]

RESUMO: O desenvolvimento de vacinas, tão importantes para a sociedade, combinam métodos in vitro e o uso de animais de laboratório (testes in vivo) em fases distintas e complementares do processo de pesquisa e validação. Embora os métodos in vitro sejam cruciais para a fase inicial, o uso de animais ainda se faz uma etapa obrigatória para garantir a segurança e eficácia dos testes em humanos. No entanto, a busca por alternativas ao uso de animais em ensaios de imunogenicidade, segurança e potência de vacinas tem sido uma constante entre pesquisadores da área. O objetivo deste estudo foi apresentar uma revisão integrativa da literatura sobre o uso de teste ELISA (Ensaio Imunoenzimático) e o Teste de Inibição da Ligação da Toxina (ToBI) adaptado para aplicação no controle de qualidade ao longo dos processos de liberação de lotes de vacinas virais. Foi realizado um levantamento nas bases de dados SciELO, PubMed e Google acadêmico. Os estudos identificados foram analisados e comparados com a prática profissional do pesquisador. Espera-se que a síntese do conhecimento apresentada contribua para novas pesquisas e práticas sobre métodos alternativos ao uso de animais nos ensaios de avaliação de segurança e produção de respostas imunológicas de vacinas virais.

Palavras-chave: Métodos alternativos. Processos de vacinas virais. Ensaio imunoenzimático. Teste de inibição da ligação da toxina.

ABSTRACT: The development of vaccines, which are of great importance to society, combines in vitro methods and the use of laboratory animals (in vivo testing) in distinct and complementary stages of the research and validation process. Although in vitro methods are crucial in the initial phase, the use of animals remains a mandatory step to ensure safety and efficacy before human trials. However, the search for alternatives to animal use in immunogenicity, safety, and vaccine potency assays has been ongoing among researchers in the field. This study aimed to analyze and synthesize the available scientific knowledge regarding the use of the ELISA test (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) and the Toxin Binding Inhibition Test (ToBI), adapted for application in quality control throughout viral vaccine batch release processes. This study consists of an integrative literature review, a method that enables the synthesis of multiple studies and approaches for a comprehensive understanding of the phenomenon. The literature search was conducted in the SciELO, PubMed, and Google Scholar databases. It is expected that the synthesis of knowledge presented will contribute to new research and practices regarding alternative methods to animal use in safety evaluation assays and in the production of immune responses for viral vaccines.

Keywords: Alternative methods. Viral vaccine processes. Enzyme-linked immunosorbent assay. Toxin binding inhibition test.

[1] Mestranda MPCAL. MPCAL - FIOCRUZ.
[2] Doutorado em Ciências. Ensino ICTB - Fiocruz.

1 INTRODUÇÃO

Este artigo apresenta uma revisão integrativa da literatura sobre o uso do Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e do Teste de Inibição da Ligação da Toxina (ToBI) Modificado no controle de qualidade de vacinas virais. O objetivo é identificar o potencial dessas técnicas como métodos alternativos ao uso de animais de laboratório, além de apontar lacunas científicas para direcionar estudos futuros.

Embora os ensaios *in vivo* ainda sejam amplamente utilizados para avaliar a potência, segurança e eficácia vacinal, eles enfrentam questionamentos crescentes. Há uma exigência global por alinhamento aos preceitos dos 3Rs (Substituição, Redução e Refinamento), às normas de bem-estar animal e à legislação vigente. Nesse cenário, o ELISA e o ToBI Modificado destacam-se como alternativas promissoras. O ELISA é uma metodologia consolidada há décadas, reconhecida por sua alta sensibilidade e especificidade (ENGVALL; PERLMANN, 1971; PLOTKIN, 2010). Já o ToBI, embora mais recente e comumente aplicado a antígenos bacterianos, oferece uma correlação superior com a resposta funcional *in vivo*.

Apesar do volume de publicações sobre o ELISA e testes de neutralização *in vitro*, a literatura é fragmentada e carece de uma síntese atualizada que consolide a aplicabilidade, as limitações e o real potencial substitutivo dessas técnicas em vacinas virais. Essa dispersão de dados dificulta a análise do estágio de maturidade metodológica, limitando decisões regulatórias e industriais (GON et al., 2023; FOSSALUZA, 2024).

A revisão integrativa da literatura se alinha aos objetivos propostos, uma vez que se propõem a identificar as publicações relevantes nas bases de dados específicas descrevendo o panorama atual do conhecimento e analisar criticamente as evidências disponíveis Ao combinar estudos com diferentes abordagens metodológicas, o trabalho contribui para uma visão abrangente do tema, permitindo discutir as implicações dos achados para o avanço da pesquisa científica e para o aprimoramento das práticas laboratoriais no contexto do desenvolvimento de vacinas. Espera-se que este estudo gere contribuições significativas tanto no campo teórico quanto no prático, ao oferecer subsídios para a formulação de recomendações e diretrizes baseadas em evidências científicas (ALVES et al., 2020; ENDO, 2021).

Os resultados poderão contribuir para a orientação futuras pesquisas, incentivo a validação e a padronização de métodos alternativos, como o ELISA e o TOBI-Test Modificado, e apoiar a transição para práticas mais éticas, eficientes e sustentáveis no controle de qualidade de vacinas virais, reduzindo a dependência do uso de animais de laboratório.

2 MÉTODOS

Esta revisão integrativa da literatura foi desenvolvida em etapas consecutivas de planejamento, busca, seleção e análise crítica do referencial teórico.

Na primeira etapa, a partir de uma delimitação do tema centrado em métodos alternativos ao uso de animais nos ensaios de segurança e de resposta imunológica de vacinas virais selecionadas, formulou-se a seguinte pergunta norteadora: Como a literatura especializada aborda o emprego do teste ELISA Direto e do TOBI-Test Modificado nos ensaios de avaliação de potência e segurança de vacinas virais na fase clínica, bem como sua relação com a indução de respostas imunológicas e a possibilidade de proposição de métodos alternativos ao uso de animais?

Na segunda etapa, o levantamento foi realizado nas bases de dados SciELO, PubMed, Google Acadêmico, utilizando a combinação das palavras-chave "ELISA direto", "ToBI-test modificado", métodos alternativos e os descritores controlados "técnicas *in vitro*", "Ensaio Imunoenzimático" e "vacinas virais". A busca restringiu-se a produções científicas publicadas no recorte temporal entre 2006 e 2026, nos idiomas português, inglês e espanhol.

Na terceira etapa, os critérios de elegibilidade foram estabelecidos para garantir o alinhamento com o objetivo do estudo. Nesse sentido, definiu-se que o acervo de análise seria constituído de artigos originais completos e dissertações que abordassem a temática da pesquisa. Foram excluídos capítulos de livros, estudos duplicados entre as bases, trabalhos que não tangenciassem o tema central e investigações sem relação com métodos alternativos ao uso de animais. Após a aplicação dos critérios de seleção e a triagem de títulos e resumos, o acervo final foi constituído por 31 estudos (29 artigos originais e 2 dissertações).

Com o acervo consolidado, procedeu-se à leitura integral dos textos selecionados e à extração sistemática dos dados por meio de uma matriz de categorização (BARDIN, 2011) previamente estruturada, visando responder à pergunta norteadora desta revisão.

Os resultados desta análise foram confrontados com a experiência profissional da pesquisadora e dessa forma, foi possível identificar evidências relevantes, lacunas do conhecimento, delimitar prioridades para estudos futuros e perspectivas quanto à substituição de modelos animais por métodos alternativos no contexto dos imunobiológicos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste artigo está sendo apresentada a síntese dos dados que constituiu uma análise qualitativa do acervo identificado. Por meio da organização e análise dos estudos foi possível identificar importantes avanços relacionados ao desenvolvimento de vacinas virais, aos métodos de avaliação imunológica e ao emprego de metodologias alternativas aplicadas ao controle de qualidade de imunobiológicos. Os trabalhos selecionados permitiram a compreensão da evolução na proteção induzida pelas vacinas e das principais técnicas laboratoriais utilizadas para avaliação de potência, segurança, estabilidade e imunogenicidade.

Identificou-se uma crescente tendência científica e regulatória voltada à substituição parcial ou total do uso de animais em ensaios biológicos, principalmente por meio de métodos *in vitro* como ELISA. Entretanto, evidenciou-se uma lacuna científica relacionada à escassez de estudos acerca do tema ToBI-teste modificado.

A partir desses achados, será apresentada a análise dos resultados obtidos tendo como referência oito categorias de base identificadas: desenvolvimento de vacinas e estratégias vacinais; resultado imunológico; eficácia vacinal; segurança e imunogenicidade vacinal; desenvolvimento e validação do método ELISA; epidemiologia; métodos alternativos; e comparação de métodos imunológicos.

Os estudos sobre criação e evolução das vacinas evidenciam a importância da imunização no controle de doenças infecciosas e no desenvolvimento da saúde pública mundial. Colocam em destaque a introdução da vacina contra a varíola por Edward Jenner como um marco científico ao demonstrar que a exposição prévia ao agente infeccioso conferia proteção. Posteriormente, os estudos de Louis Pasteur consolidaram os princípios da imunização ao desenvolver vacinas utilizando microrganismos atenuados, contribuindo significativamente para a microbiologia e imunologia moderna (ABBAS, LICHTMAN; PILLAI, 2019; ALVES et al., 2020).

Outro ponto de destaque refere-se a evolução tecnológica das vacinas para o desenvolvimento de diferentes plataformas imunizantes, classificadas em vacinas de primeira, segunda e terceira geração. As vacinas de primeira geração, compostas por microrganismos vivos atenuados ou inativados, apresentam elevada capacidade imunogênica devido à ampla estimulação do sistema imune. Algumas limitações relacionadas à segurança permanecem relevantes, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, já as vacinas de segunda geração, baseadas em proteínas purificadas e subunidades antigênicas, apresentam maior

segurança biológica, porém frequentemente necessitam de adjuvantes para potencializar a resposta imunológica (CASTIÑEIRAS; MARTINS; PEDRO, 2022). Os avanços da biotecnologia permitem o desenvolvimento das vacinas de terceira geração utilizando tecnologias de DNA recombinante, RNA mensageiro e vetores virais (LIMA, GATTI, SILVA, 2023).

Há um destaque para as plataformas vacinais desenvolvidas durante a pandemia de COVID-19, período em que houve aceleração sem precedentes na produção de imunizantes. Alves et al. (2020) e Endo (2021) afirmam que as vacinas de mRNA representam um importante avanço científico devido à rapidez de desenvolvimento, elevada especificidade antigênica e possibilidade de adaptação frente às variantes virais emergentes. As vacinas de vetor viral também apresentam relevância durante a pandemia, principalmente pela capacidade de induzir resposta humoral e celular robusta. Fica evidente que as vacinas virais continuam representando uma das estratégias mais eficazes para a prevenção de doenças infecciosas, principalmente pela capacidade de estimular respostas imunológicas específicas.

A literatura selecionada revela, ainda, que os avanços das plataformas vacinais ocorreram paralelamente ao desenvolvimento da imunologia e da biotecnologia molecular permitindo a ampliação das tecnologias utilizadas na produção de imunobiológicos. Autores como Abbas, Lichtman, Pillai (2019) e Lima, Gatti e Silva (2023) indicam que a evolução das vacinas tradicionais para as plataformas mais modernas possibilitou maior especificidade antigênica, redução de riscos biológicos e otimização dos processos produtivos.

Por sua vez, as vacinas de vírus atenuados permanecem entre as plataformas mais imunogênicas, principalmente pela capacidade de mimetizar a infecção natural. A replicação controlada do vírus no organismo favorece a ativação simultânea da imunidade humoral e celular, promovendo uma resposta imunológica prolongada. Castiñeiras, Martins e Pedro (2022) revelam que algumas formulações administradas por via intranasal apresentam capacidade adicional de induzir imunidade de mucosa considerada importante frente às infecções respiratórias virais, mas afirmam também que apesar da elevada eficácia apresentam limitações importantes que estão relacionadas com a segurança principalmente em indivíduos imunocomprometidos.

Entre os principais riscos associados às vacinas atenuadas destaca-se a possibilidade de reversão de atenuação viral. Yao et al. (2022) identificaram que vírus vacinais de RNA podem sofrer mutações durante o processo replicativo, recuperando parcialmente características de

virulência, neste estudo o fenômeno foi particularmente observado em variantes derivadas da vacina oral contra poliomielite, responsáveis por surtos em populações com baixa cobertura vacinal. A literatura em questão reforça a necessidade de monitoramento epidemiológico contínuo, controle rigoroso da produção e manutenção de altas taxas de imunização coletiva.

Lima, Gatti e Silva (2023) apontam que as vacinas de vírus inativados possuem como principal vantagem o elevado perfil de segurança biológica, visto que o vírus perde sua capacidade de replicação. A literatura em questão aponta que essa característica amplia sua utilização em grupos vulneráveis, incluindo gestantes e indivíduos imunossuprimidos. Contudo, os resultados revelam que a ausência de replicação viral reduz a intensidade da resposta imunológica, tornando necessária a administração de doses de reforço para manutenção de títulos protetores de anticorpos. Alguns estudos relataram respostas inflamatórias exacerbadas associadas à utilização de vírus inteiros inativados incluindo eosinofilia e reações de hipersensibilidade (CASTIÑEIRAS, MARTINS E PEDRO, 2022).

No estudo de Alves et al. (2020) as vacinas de vetor viral surgem como uma alternativa intermediária entre segurança e imunogenicidade, o presente estudo revela que essa tecnologia utiliza vírus geneticamente modificados para transportar genes do patógeno até as células do hospedeiro, promovendo a produção intracelular de antígenos virais e estimulando respostas celulares e humorais robustas.

Lima, Gatti e Silva (2023) apontam diferenças importantes entre vetores virais replicantes e não replicantes, sendo que os não replicantes apresentam maior segurança, por não se multiplicarem após a infecção celular, características que favoreceu sua ampla utilização em vacinas humanas recentes. Em contrapartida, os vetores replicantes promovem maior amplificação antigênica e respostas imunes mais duradouras, embora possam apresentar limitações de segurança em indivíduos imunocomprometidos.

No que se refere as vacinas de mRNA, os estudos revelam elevada imunogenicidade humoral e celular, com produção significativa de anticorpos neutralizantes. Alguns autores abordam as vantagens relacionadas à produção em larga escala e à ausência de risco infeccioso associado ao agente vacinal. No entanto, os estudos de Lima, Gatti e Silva (2023) demonstram que a instabilidade do RNA ainda representa um desafio importante, exigindo sistema de encapsulamento lipídico e condições específicas de armazenamento.

Sobre a vacinas de DNA, os estudos analisados revelam que essa plataforma se destaca pela estabilidade estrutural dos plasmídeos e pela capacidade de indução de respostas celulares

mediadas por linfócitos T citotóxicos. No artigo de Alves et al. (2020) o mecanismo consiste na introdução de plasmídeos contendo genes virais no organismo, permitindo que as próprias células sintetizem os antígenos imunizantes. Observa-se, a partir da análise deste artigo, que se evidenciam vantagens relacionadas ao menor custo de produção e à maior estabilidade físico-química quando comparadas às vacinas de mRNA. Porém, as vacinas de DNA ainda enfrentam limitações importantes relacionadas à baixa eficiência de transferência plasmidial e às preocupações referentes à integração genética no genoma hospedeiro, segundo Castiñeiras, Martins e Pedro (2022). Embora representem uma plataforma promissora, a literatura evidencia a necessidade de estudos adicionais voltados para a segurança, eficácia clínica e padronização tecnológica.

A literatura demonstra que a produção de imunobiológicos envolve etapas biológicas e farmacêuticas rigorosamente controladas, incluindo cultivo viral, purificação antigênica, validação de processos e ensaios pré-clínicos e clínicos (MOTA, BATISTA, GONÇALVES, 2022). Os avanços recentes da biotecnologia permitiram significativa redução do tempo de desenvolvimento vacinal, especialmente durante emergências sanitárias globais, sem eliminar a necessidade de avaliações rigorosas de qualidade e segurança.

O estudo de Endo et al. (2021) revelam que os ensaios clínicos continuam sendo fundamentais para a validação da eficácia viral. As fases I, II e III permitem a avaliação progressiva da segurança, imunogenicidade e efetividade em populações cada vez maiores, enquanto a fase IV permanece responsável pela farmacovigilância pós comercialização e identificação de eventos adversos raros em condições reais de uso. Este monitoramento contínuo tornou-se essencial diante da rápida implementação de novas plataformas vacinais nos últimos anos.

No contexto da experimentação animal, os resultados evidenciam forte dependência histórica dos modelos *in vivo* no controle de qualidade de vacinas. Os estudos apontam que aproximadamente 80% dos animais utilizados pela indústria farmacêutica são empregados em ensaios de segurança e potência para liberação de lotes vacinais. Moreira et al. (2020) afirmam que essa utilização permanece associada à necessidade regulatória de avaliar respostas biológicas complexas ainda difíceis de serem completamente reproduzidas por métodos alternativos.

É possível perceber um crescimento significativo dessas discussões éticas relacionadas ao uso de animais em pesquisa. A legislação brasileira, especialmente após a criação da Lei Arouca e do CONCEA, fortalece mecanismos de regulamentação e incentivo à implantação de

métodos alternativos alinhados aos princípios dos 3Rs: redução, refinamento e substituição. Santos et al. (2021) indicam que a consolidação dessas políticas vem estimulando o desenvolvimento de metodologias *in vitro* mais sensíveis, padronizadas e reprodutíveis.

Os estudos de Gon et al. (2023) e Morgeaux et al. (2017) consolidam o método ELISA como ferramenta aplicada ao controle de qualidade de vacinas virais que representa um dos avanços mais relevantes na modernização dos métodos imunológicos utilizados na produção de imunobiológicos. Demonstram que a técnica evoluiu de um método inicialmente voltado à detecção de anticorpos para uma plataforma multifuncional empregada na quantificação antigênica, monitoramento de imunogenicidade e avaliação da consistência produtiva de vacinas. Além disso, a viabilidade e a confiabilidade do método ELISA para avaliação de potência de vacinas virais favorecem a padronização dos processos de produção e liberação de lotes. Essa ampliação de aplicabilidade acompanha o desenvolvimento biotecnológico das vacinas modernas e a crescente necessidade de métodos mais rápidos, padronizáveis e eticamente sustentáveis, principalmente diante das discussões sobre redução do uso de animais em ensaios laboratoriais.

Os resultados observados evidenciam que a elevada sensibilidade analítica do ELISA está diretamente relacionada à especificidade das interações antígeno-anticorpo e à estabilidade das condições experimentais utilizadas. Analisando a obra de Pereira (2019) nota-se que a formação do complexo imune depende não apenas da quantidade de anticorpos presentes nas amostras, mas também da afinidade molecular envolvida e da adequada exposição dos epítopos antigênicos. Este aspecto possui grande relevância no contexto vacinal, pois vacinas contendo antígenos desnaturados, degradados ou parcialmente modificados podem apresentar redução significativa na capacidade de ligação imunológica, comprometendo a confiabilidade do ensaio.

Na análise dos estudos relacionados ao ToBI, evidencia-se que o método vem adquirindo importância crescente no contexto do controle de qualidade de imunobiológicos que utilizam antígenos bacterianos, principalmente pela possibilidade de redução parcial ou substituição de ensaios tradicionalmente realizados em animais. Em contrapartida, o método ToBI modificado para vacinas virais se mostra limitado e pouco explorado na literatura cientifica. Gon et al. (2023) revelam-se que o ToBI se consolidou como um ensaio funcional capaz de avaliar indiretamente a atividade biológica de antígenos e antitoxinas por meio da capacidade de bloqueio de interação toxina-anticorpo, característica que aproxima o método da resposta imunológica observada *in vivo*. O ensaio passou a ser discutido não apenas como técnica

laboratorial alternativa, mas também como estratégia alinhada às exigências contemporâneas relacionadas aos princípios éticos dos 3Rs e à necessidade de modernização dos processos regulatórios aplicados aos imunobiológicos.

Matos et al. (2002) indicam que a principal contribuição do ToBI está associada ao seu caráter funcional. Diferentemente de métodos exclusivamente quantitativos, o ensaio avalia a capacidade de neutralização mediada por anticorpos, permitindo inferir a atividade biológica do sistema toxina-antitoxina. Essa abordagem aproxima o método das condições fisiológicas relacionadas à proteção imunológica, uma vez que a lógica do ensaio se baseia justamente na inibição da ligação da toxina ao seu alvo biológico. Esta característica explica por que vários estudos apontam melhor correlação do ToBI com ensaios de neutralização em animais, que utilizam antígenos bacterianos quando comparado a determinados formatos de ELISA baseados apenas na detecção antigênica.

Outro aspecto importante observado refere-se à simplicidade operacional do método. O ToBI utiliza princípios técnicos parecidos aos empregados em ensaios de imunoenzimáticos convencionais, incluindo placas sensibilizadas, etapas de bloqueio e incubação controlada. A principal diferença está na interpretação funcional da interação imunológica controlada. Embora o ensaio seja considerado relativamente simples do ponto de vista metodológico, sua implementação em rotina laboratorial exige rigor na definição das condições analíticas para evitar variações experimentais significativas.

Na perspectiva de Sobrinho et al. (2014), o método ToBi demonstrou alta sensibilidade e forte correlação entre a absorbância e a concentração de toxoide épsilon, sendo capaz de detectar diferentes concentrações do antígeno quando comparado ao ensaio *in vivo*, indicando potencial para aplicação no controle de qualidade de imunobiológicos.

Corroborando esses achados, Nundes et al. (2022) evidenciaram que o ToBI ganhou relevância por representar uma alternativa concreta frente aos testes de potência tradicionalmente dependentes de modelos animais. Historicamente, a avaliação de soros e vacinas esteve associada a ensaios de soroneutralização e desafio biológico em camundongos e cobaias, principalmente para imunobiológicos relacionados a toxinas bacterianas. Contudo, com o avanço das discussões éticas e regulatórias, métodos capazes de reproduzir parcialmente respostas funcionais *in vitro* passaram a receber maior atenção científica. Nesse contexto, a incorporação do ToBI à Farmacopeia Europeia representou um importante reconhecimento regulatório do potencial do método para aplicações laboratoriais e industriais.

Os resultados analisados revelam que a adoção de métodos alternativos como o ToBI possui impacto direto na redução do uso de animais de laboratório. No estudo de Gon *et al.* (2023) revela que testes de potência representam uma das principais fontes de utilização de animais na rotina de produção de imunobiológicos. A substituição parcial destes ensaios por metodologias sorológicas *in vitro* contribui não apenas para atender exigências éticas, mas também para reduzir custos operacionais, tempo analítico e variabilidade biológica associada aos modelos animais.

Dentro desse cenário de evolução metodológica, o ToBI modificado apresenta potencial para ampliar as possibilidades de aplicação de ensaios de potência e segurança em vacinas virais, especialmente considerando as inúmeras vantagens demonstradas na literatura.

A partir dos estudos analisados é possível afirmar que o método apresenta alta sensibilidade, boa correlação com os ensaios *in vivo*, elevado potencial de padronização, menor tempo de execução e menores custos operacionais, além da diminuição do uso de animais em testes de controle de qualidade. Entretanto, os a literatura disponível sobre o tema ainda é limitada e concentra-se, predominantemente, em imunobiológicos que contêm antígenos bacterianos, indicando a necessidade de novas pesquisas voltadas à adaptação e validação do método ToBi modificado para ser utilizado em ensaios de potência em vacinas virais.

4 CONCLUSÃO

A análise dos estudos revelou que o avanço biotecnológico no desenvolvimento vacinal ampliou significativamente a complexidade dos sistemas de controle de qualidade, tornando necessária a adoção de metodologias capazes de monitorar com maior precisão parâmetros como potência, identidade, estabilidade antigênica e respostas imunológicas. Diante disto, verificou-se que os ensaios *in vitro* apresentam vantagens importantes em relação aos testes tradicionais *in vivo*, sobretudo pela redução da variabilidade biológica, maior rapidez na obtenção dos resultados e possibilidade de padronização metodológica entre laboratórios e lotes produtivos.

Dentre os métodos analisados, o ELISA revelou ampla aplicabilidade no monitoramento de antígenos e anticorpos relacionados às vacinas virais. Sua elevada sensibilidade, especificidade e versatilidade metodológica, por meio das diferentes modalidades do ensaio (direto, indireto, sanduíche e competitivo), tornam esse método altamente adaptável às necessidades laboratoriais e industriais, além disso, por se tratar de uma técnica tradicional, amplamente utilizada e padronizada ao longo dos anos. Observa-se que o ELISA pode ser

aplicado tanto nas etapas de desenvolvimento vacinal quanto no controle em processo, estudos de estabilidade e avaliação de imunogenicidade, contribuindo para análises quantitativas confiáveis, reprodutíveis e adequadas ao controle de qualidade.

A revisão revelou que embora o ELISA apresente elevado potencial substitutivo, sua utilização isolada ainda encontra limitações importantes quando o objetivo envolve inferir proteção imunológica efetiva. Em vários estudos nota-se que a quantificação antigênica nem sempre se correlaciona diretamente com a funcionalidade imunológica ou com a capacidade neutralizante dos anticorpos produzidos. Torna-se evidente que a interpretação dos resultados deve considerar aspectos imunológicos mais amplos incluindo correlatos de proteção e resposta funcional do sistema imune. No entanto, a aplicação do ELISA depende da modalidade escolhida, uma vez que cada formato apresenta característica específicas e desenho analítico, devendo ser considerados os objetivos dessa análise.

No caso do ToBI e de suas adaptações metodológicas, os resultados encontrados mostraram importante potencial no contexto do controle de qualidade de imunobiológicos, principalmente por seu caráter funcional. Diferentemente de métodos exclusivamente quantitativos, o ToBI permite inferir a atividade funcional dos anticorpos ao avaliar a capacidade de inibição da ligação entre toxinas, antígenos e anticorpos específicos. Essa característica aproxima seus resultados das respostas obtidas nos ensaios de neutralização *in vivo*, reforçando sua relevância científica e regulatória. Apresentando, inclusive, desempenho superior ao ELISA direto modificado, o método demonstrou ser capaz de detectar pequenas concentrações do analito, além de apresentar boa precisão e reprodutibilidade dos resultados, reforçando seu potencial para aplicação no controle de qualidade de imunobiológicos.

As adaptações do ToBI-Teste tradicional para o ToBI modificado evidenciaram avanços significativos relacionados à estabilidade metodológica, padronização experimental e à capacidade discriminatória entre amostras e lotes vacinais, mostrando-se particularmente promissor para avaliações de potência e consistência produtiva.

Ainda que o ToBi apresente um conjunto expressivo de vantagens, aproximando-se de forma relevante resultados obtidos em ensaios de neutralização *in vivo*, a produção científica de estudos dedicada à aplicação desse método ainda é limitada, especialmente em antígenos virais. Neste cenário, observa-se uma lacuna metodológica importante na literatura científica, evidenciando a necessidade de maior padronização, reprodutibilidade e validação do ensaio.

Diante disso, torna-se imprescindível o desenvolvimento de novos estudos que sustentem sua validação e ampliem sua aplicação em testes de potência de vacinas virais.

Outro fator relevante identificado ao longo do desenvolvimento do presente trabalho foi a crescente incorporação dos métodos alternativos nas discussões regulatórias nacionais e internacionais. Nota-se que órgãos reguladores e farmacopeias internacionais vêm progressivamente reconhecendo ensaios *in vitro* como ferramentas válidas para complementar ou substituir determinados testes baseados em animais, especialmente quando adequadamente validados. Portanto, os estudos também revelaram que ainda existem desafios relacionados à harmonização regulatória, validação multicêntrica e estabelecimento de parâmetros universalmente aceitos para liberação de lotes vacinais.

A literatura analisada revelou que a implementação de métodos alternativos apresenta benefícios que transcendem a dimensão ética. Além da redução de sofrimento animal, nota-se potencial para diminuição de custos operacionais, otimização do tempo de análise, aumento da produtividade laboratorial e melhoria da reprodutibilidade dos resultados. Alguns aspectos tornam esses métodos particularmente relevantes para Laboratórios Produtores Oficiais e para a indústria farmacêutica, sobretudo em cenários de alta demanda por imunobiológicos, como epidemias e pandemias.

Ainda que os resultados sejam promissores, verificou-se que a substituição completa dos testes *in vivo* ainda não representa uma realidade plenamente consolidada para todos os tipos de vacinas virais. Em vários contextos, permanece necessária a associação entre métodos *in vitro* e ensaios biológicos tradicionais para garantir segurança, eficácia e confiabilidade regulatória. Desta forma, o fortalecimento de pesquisas voltadas à validação analítica, correlação imunológica e padronização internacional revela-se necessário para ampliar a aceitação desses métodos no futuro.

Conclui-se que o ELISA e o ToBI-Test modificado representam ferramentas estratégicas no processo de modernização de controle de qualidade de vacinas virais, configurando importantes alternativas científicas ao uso de animais em experimentação. A continuidade dos investimentos em pesquisa, validação e tecnológica regulamentação poderá favorecer uma transição progressiva para modelos laboratoriais mais éticos, eficientes e sustentáveis, fortalecendo simultaneamente a qualidade dos imunobiológicos e o compromisso científico com práticas experimentais responsáveis.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.

ALVES, P. S.; *et al*. Vacinas: história, tecnologia e desafios para terapia contra o SARS-CoV-2. **ULAKES Journal of Medicine**, São José do Rio Preto, v. 1, ed. especial, p. 125–141, 2020.

BARDIN, L. **Análise de conteúdo**. Lisboa: Edições 70, 2011.

CASTIÑEIRAS, T. M. P. P.; MARTINS, F. S. V.; PEDRO, L. G. F. **Vacinas**: princípios gerais. Rio de Janeiro: CIVES/UFRJ, 2022. Texto técnico.

ENDO, T. H. Vacinas virais e perspectivas para o controle de epidemias e pandemias. ***Ciências da Saúde***: desafios, perspectivas e possibilidades, v. 1, 2021. DOI: https://dx.doi.org/10.37885/210604998.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, v. 8, n. 9, p. 871–874, 1971.

FOSSALUZA, G. R. **Avanço dos métodos alternativos ao uso de animais na experimentação para registro de produtos biológicos**. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotérios) — Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan, São Paulo, 2024.

GON, R. K. *et al*. Métodos alternativos aplicados em imunobiológicos no Brasil. **Vigilância Sanitária em Debate**: Sociedade, Ciência & Tecnologia, Rio de Janeiro, v. 11, e02126, 2023.

LIMA, J. V. S.; GATTI, L. L.; SILVA, D. F. Vacinas, avanços biotecnológicos e o papel do biomédico. *In*: LIMA, J. V. S. (org.). **A dinâmica do conhecimento biomédico**. Ourinhos, SP: UNIFIO, 2023. cap. 6.

MOREIRA, W. C.; *et al*. Immunobiological potency test: validation approach. **Vigilância Sanitária em Debate**: Sociedade, Ciência & Tecnologia, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p. 48-61, 2020.

MORGEAUX, S.; et al. **Substituição dos testes de potência da vacina antirrábica humana *in vivo* pela quantificação *in vitro* de glicoproteínas utilizando ELISA:** resultados de um estudo colaborativo internacional. Vaccine, v. 35, n. 6, p. 966–971, 7 fev. 2017. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.12.039.

MOTA, G. A.; BATISTA, L. M.; GONÇALVES, J. C. R. Etapas de desenvolvimento de vacinas: uma revisão narrativa. **Archives of Health**, Curitiba, v. 3, n. 2, p. 341-346, mar. 2022.

NUNDES, R. N. C. *et al*. Métodos alternativos para determinação da potência de veneno e antiveneno botrópico. **Vigilância Sanitária em Debate**: Sociedade, Ciência & Tecnologia, Rio de Janeiro, v. 10, n. 3, p. 106-121, ago. 2022.

PEREIRA, R. L. G. **Comparação de técnicas de ensaio de absorção imunoenzimático (ELISA) para avaliação da reatividade de anticorpos anticocaína tipo IgG em camundongos**. 2019. Dissertação (Mestrado em Medicina Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

SANTOS, E. J. R. *et al*. Uso de animais na experimentação animal: Revisão. **Pubvet**, v. 15, n. 9, a910, p. 1-8, set. 2021.

SOBRINHO, E. M.; ALMEIDA, A. C.; SANTOS, H. O.; et al. ELISA and modified toxin-binding inhibition (ToBI) test as alternatives to in vivo assay in the quality control of Clostridium perfringens epsilon toxoid. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e** Zootecnia, v. 66, n. 3, p. 713-720, 2014.

SOBRINHO, E. M.; *et al*. Modified toxin-binding inhibition (ToBI) test for quantification of epsilon antitoxin in serum from immunized sheep. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, p. 326-330, 2011.

YAO, X.; HE, W.; WU, X.; et al. Long-term immunopersistence and safety of the Escherichia coli-produced HPV-16/18 bivalent vaccine in Chinese adolescent girls. Human Vaccines & Immunotherapeutics, v. 18, n. 5, art. 2061248, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1080/21645515.2022.2061248. Acesso em: 27 jun. 2026.