

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Danielle Sophia Ferreira Santos Braga

**ELEIÇÃO DE LOTE DE REFERÊNCIA DE TRABALHO DA VACINA ORAL  
POLIOMIELITE BIVALENTE (VOPb)**

Rio de Janeiro

2018

Danielle Sophia Ferreira Santos Braga

ELEIÇÃO DE LOTE DE REFERÊNCIA DE TRABALHO DA VACINA ORAL  
POLIOMIELITE BIVALENTE (VOPb)

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista.

**Tutora:** Cátia Inês Costa

**Preceptoras:** Anna Christina Rosa Guimarães

Renata Faria de Carvalho

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Braga, Danielle Sophia Ferreira Santos

Eleição de Lote de Referência de Trabalho da Vacina Oral Poliomielite Bivalente (VOPb). / Danielle Sophia Ferreira Santos Braga. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2018.

51 f. : fig. ; tab.

Monografia (Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

Tutora: Cátia Inês Costa.

Preceptoras: Anna Christina Rosa Guimarães e Renata Faria de Carvalho.

1. Poliomielite. 2. Vacinas contra Poliovírus. 3. Ensaio de potência.  
4. Potência de Vacina. I. Título.

Election of a Working Reference Material of Bivalent Oral Polio Vaccine (bOPV).

Danielle Sophia Ferreira Santos Braga

**ELEIÇÃO DE LOTE DE REFERÊNCIA DE TRABALHO DA VACINA ORAL  
POLIOMIELITE BIVALENTE (VOPb)**

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista.

Aprovado em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Fausto Klabund Ferraris (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Lúcia Maria Corrêa Werneck (Mestre)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Cátia Inês Costa (Doutora) – Tutora

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Renata Faria de Carvalho (Mestre) – Preceptora / Suplente

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

**DEDICO...**  
**AOS MEUS AMADOS PAIS,**  
**ANTONIO (*in memorian*) E TANIA.**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antonio (*in memorian*) e Tania, pelo amor incondicional, pelos ensinamentos ao longo da vida e por sempre terem acreditado no meu potencial. Todas as minhas conquistas são e sempre serão dedicadas a eles.

À minha tutora, Dra. Cátia Inês Costa, pela orientação e pelos conhecimentos compartilhados ao longo desses dois anos do Curso de Residência Multiprofissional.

À minha preceptora, Ma. Renata Carvalho, pelos ensinamentos passados, pela compreensão, pela ajuda e, principalmente, pelo incentivo nos momentos de desânimo.

À minha preceptora, Ma. Anna Christina Guimarães, pela ajuda dispensada.

Aos colegas do Setor de Cultura de Células, Simone Bastos e Rubens Júnior, pelo convívio, pelas dicas e pela amizade; e à querida Inah do Arte, pela parceria no dia-a-dia do laboratório e pelas incontáveis ajudas com os ensaios.

Aos colegas do Laboratório de Vacinas Virais e Cultura de Células, Jarbas Emílio dos Santos e Patrícia Alves, pelas valiosas contribuições nos ensaios.

Aos amigos da turma da Residência, por todos os momentos divertidos compartilhados; e ao querido amigo Pablo Coimbra, pela amizade e pelo carinho de sempre.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária.

Aos funcionários do Departamento de Imunologia (INCQS / Fiocruz).

E a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Obrigada a todos!

*O insucesso é apenas uma oportunidade  
para recomeçar com mais inteligência.*

*Henry Ford*

## RESUMO

A poliomielite ou “paralisia infantil” é uma doença infectocontagiosa viral aguda, causada por poliovírus pertencentes ao gênero *Enterovirus*, à família *Picornaviridae*, e compostos por três sorotipos imunologicamente distintos: 1, 2 e 3. O poliovírus é um patógeno exclusivamente humano, cuja transmissão ocorre pela via fecal-oral ou, mais raramente, pela via oral-oral. A poliomielite não possui tratamento específico. Sua prevenção se dá através de vacinação, havendo duas vacinas disponíveis: (a) Sabin, vacina oral e composta por vírus atenuado [dois tipos: vacina oral poliomielite trivalente (VOPt, sorotipos 1, 2 e 3) e vacina oral poliomielite bivalente (VOPb, sorotipos 1 e 3)] e (b) Salk, vacina injetável e composta por vírus inativado (vacina inativada poliomielite – VIP, sorotipos 1, 2 e 3). A poliomielite é uma doença em processo de erradicação, sendo esta uma prioridade mundial de saúde. O plano final para a sua eliminação propôs, em 2016, a substituição do uso da VOPt pela VOPb e a inclusão de, pelo menos, uma dose da VIP nos esquemas de vacinação. O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) é o órgão responsável pelas análises das vacinas utilizadas no Programa Nacional de Imunizações (PNI) e, portanto, realiza a avaliação da potência das vacinas contra a poliomielite. Para realizar os ensaios de potência, deve-se usar uma vacina de Referência de Trabalho validada, testada em paralelo às vacinas em análise. A Referência de Trabalho atualmente em uso no laboratório consiste num lote comercial da VOPb, com validade de dois anos. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo eleger um novo lote da VOPb que pudesse ser usado como Referência de Trabalho nos ensaios de potência, antes do término do lote em uso. O ensaio de potência baseia-se em um teste *in vitro*, que quantifica a infectividade do vírus total e dos dois sorotipos presentes na VOPb (sorotipos 1 e 3) em culturas de células Hep-2C, através da avaliação do efeito citopático celular, expresso em CCID<sub>50</sub>. Os ensaios foram realizados por dois analistas diferentes, em dias diferentes. Os ensaios realizados pelo Analista 1 mostraram resultados de potência satisfatórios para o lote candidato à nova Referência de Trabalho, enquanto que o ensaio realizado pelo Analista 2 não pôde ser considerado válido, devido à inviabilidade das células. Após uma criteriosa avaliação dos parâmetros que levaram à não aprovação do ensaio feito pelo Analista 2, o laboratório pretende retomar as análises de potência para o lote candidato.

Palavras-chave: Poliomielite. Vacina Oral Poliomielite Bivalente. Ensaio de Potência.



## ABSTRACT

Poliomyelitis, also known as infantile paralysis, is an acute infectious and contagious disease caused by viruses named polioviruses (genus *Enterovirus*, family *Picornaviridae*). There are three types of immunologically distinct polioviruses: serotypes 1, 2 and 3. Poliovirus is an exclusively human pathogen, which is spread from person to person via fecal-oral or, more rarely, oral-oral routes. Polio has no specific treatment. Its prevention is given through vaccination, with the following vaccines: (a) Sabin vaccine, an oral vaccine based on live-attenuated virus [two types: trivalent oral polio vaccine (tOPV, serotypes 1, 2 and 3) and bivalent oral polio vaccine (bOPV, serotypes 1 and 3)] and (b) Salk vaccine, an injectable vaccine based on chemically inactivated virus (inactivated polio vaccine – IPV, serotypes 1, 2 and 3). There are major efforts towards polio eradication, which is a global health priority. In 2016, the final stage of the strategic plan proposed the switch from tOPV to bOPV and the introduction of at least one dose of IPV in vaccination schedules. The National Institute for Quality Control in Health (INCQS) is responsible for the analysis of all vaccines used in the National Immunization Program (PNI) and, therefore, evaluates the potency of polio vaccines. In every potency assay performed, a validated Working Reference vaccine must be tested in parallel to the vaccines under analysis. The Working Reference vaccine currently in use in the laboratory consists of a commercial batch of bOPV, with expiry date of two years. In this context, the present study aimed to elect a new batch of bOPV that could be used as a Working Reference material in the potency tests, before the ending of the batch currently in use. The potency assay is based on an *in vitro* test, which quantifies the infectivity in Hep-2C cell cultures of total virus and the two serotypes present in bOPV (serotypes 1 and 3). The infectivity is evaluated by the cell cytopathic effect and expressed in CCID<sub>50</sub>. The assays were performed by two different analysts, on different days. Tests performed by Analyst 1 showed satisfactory potency results for the candidate batch, while the assay performed by Analyst 2 could not be considered valid due to cell's unviability. After a careful evaluation of the aspects that led to the non approval of the assay performed by Analyst 2, the laboratory intends to resume the potency tests for the candidate batch.

Keywords: Poliomyelitis. Bivalent Oral Polio Vaccine. Potency testing.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura esquemática do poliovírus. ....	13
Figura 2 – Esquema representativo da inoculação vertical das diluições na microplaca. ....	33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Casos de poliomielite causados por poliovírus selvagem, de 2013 a 2017, divididos pelas seis regiões da OMS. ....	17
Tabela 2 – Mudanças no esquema vacinal VIP/VOP após a interrupção do uso da VOPt, em 2016. ....	23
Tabela 3 – Valores da validação da potência da vacina de Referência de Trabalho em uso. ...	28
Tabela 4 – Critérios para a aprovação do ensaio de potência da vacina bivalente. ....	29
Tabela 5 – Denominação e componentes usados em cada antissoro preparado. ....	31
Tabela 6 – Esquema de diluições para a determinação da potência da vacina bivalente. ....	32
Tabela 7 – Analista 1   Leitura dos resultados da titulação do sorotipo 1 do lote A: número de orifícios positivos para o efeito citopático. ....	35
Tabela 8 – Analista 1   Leitura dos resultados da titulação do sorotipo 3 do lote A: número de orifícios positivos para o efeito citopático. ....	35
Tabela 9 – Analista 1   Leitura dos resultados da titulação do vírus total (bivalente) do lote A: número de orifícios positivos para o efeito citopático. ....	36
Tabela 10 – Analista 1   Leitura dos resultados da titulação do sorotipo 1 do lote B: número de orifícios positivos para o efeito citopático. ....	36
Tabela 11 – Analista 1   Leitura dos resultados da titulação do sorotipo 3 do lote B: número de orifícios positivos para o efeito citopático. ....	37
Tabela 12 – Analista 1   Leitura dos resultados da titulação do vírus total (bivalente) do lote B: número de orifícios positivos para o efeito citopático. ....	37
Tabela 13 – Analista 1   Valores de potência (em $\log_{10}$ ), médias (em $\log_{10}$ ) e desvios-padrões calculados para cada sorotipo presente no lote A. ....	38
Tabela 14 – Analista 1   Valores de potência (em $\log_{10}$ ), médias (em $\log_{10}$ ) e desvios-padrões calculados para cada sorotipo presente no lote B. ....	39
Tabela 15 – Analista 2   Leitura dos resultados da titulação do sorotipo 1 do lote A: número de orifícios positivos para o efeito citopático. ....	39
Tabela 16 – Analista 2   Leitura dos resultados da titulação do sorotipo 3 do lote A: número de orifícios positivos para o efeito citopático. ....	40
Tabela 17 – Analista 2   Leitura dos resultados da titulação do vírus total (bivalente) do lote A: número de orifícios positivos para o efeito citopático. ....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC – Coleção Americana de Culturas de Células

CC – Controle de células

CCID<sub>50</sub> – Dose infectante de 50% da cultura celular

cVDPV – Poliovírus circulante derivado da vacina

DI – Departamento de Imunologia

DMEM – Meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco

DP – Desvio-padrão

DTP-VIP/Hib – Vacina adsorvida contra difteria, tétano, pertussis, poliomielite e meningite causada por *Haemophilus influenzae* tipo b

DTP-VIP-HB/Hib – Vacina adsorvida contra difteria, tétano, pertussis, poliomielite, hepatite B e meningite causada por *Haemophilus influenzae* tipo b

ECACC – Coleção Europeia de Culturas de Células Autenticadas

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

GPEI – Iniciativa Global para a Erradicação da Poliomielite

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

LM – Lotes de células-mestre

LT – Lotes de células de trabalho

LVV/CC – Laboratório de Vacinas Virais, Biofármacos e Cultura de Células

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

PNI – Programa Nacional de Imunizações

POP – Procedimento operacional padronizado

RNA / RNAm – Ácido ribonucléico / Ácido ribonucléico mensageiro

SBIM – Sociedade Brasileira de Imunizações

SNC – Sistema nervoso central

VAPP – Paralisia associada à vacina

VIP – Vacina inativada poliomielite (em inglês, *inactivated polio vaccine – IPV*)

VOP – Vacina oral poliomielite

VOP1m – Vacina oral poliomielite monovalente para o sorotipo 1

VOP3m – Vacina oral poliomielite monovalente para o sorotipo 3

VOPb – Vacina oral poliomielite bivalente (em inglês, *bivalent oral polio vaccine – bOPV*)

VOPt – Vacina oral poliomielite trivalente (em inglês, *trivalent oral polio vaccine – tOPV*)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>1.1 Poliomielite: agente etiológico, transmissão e manifestações clínicas da doença</b> ...	13
<b>1.2 Aspectos históricos e epidemiológicos</b> .....	15
<b>1.3 Programa Nacional de Imunizações</b> .....	17
<b>1.4 Vacinas contra a poliomielite</b> .....	18
1.4.1 Vacina Salk ou Vacina Inativada Poliomielite (VIP).....	18
1.4.2 Vacina Sabin ou Vacina Oral Poliomielite (VOP).....	20
<b>1.5 Erradicação da poliomielite</b> .....	22
1.5.1 Plano estratégico final: mudança da VOPT para a VOPb .....	22
<b>1.6 Controle da qualidade dos imunobiológicos adquiridos pelo PNI</b> .....	24
1.6.1 Ensaios de potência das vacinas.....	24
1.6.2 Uso de culturas de células em ensaios biológicos.....	25
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	26
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	27
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	27
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	27
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
<b>4.1 Lote candidato à vacina de Referência de Trabalho – lote A</b> .....	28
<b>4.2 Vacina de Referência de Trabalho atual – lote B</b> .....	28
<b>4.3 Determinação da potência das vacinas</b> .....	29
4.3.1 Culturas de células .....	29
4.3.2 Preparo e fornecimento da suspensão celular Hep-2C.....	30
4.3.3 Preparo dos antissoros .....	30
4.3.4 Preparo do meio de diluição das vacinas .....	31
4.3.5 Procedimentos para diluição e soroneutralização das vacinas .....	31
4.3.6 Distribuição da suspensão celular nas microplacas.....	33
4.3.7 Inoculação das diluições na cultura de células.....	33
4.3.8 Leitura e avaliação estatística dos resultados .....	34
<b>4.4 Critérios de validação do ensaio</b> .....	34
<b>4.5 Política de reteste</b> .....	34
<b>5 RESULTADOS</b> .....	35
<b>5.1 Ensaios de potência – Analista 1</b> .....	35

5.1.1 Cálculo das potências das vacinas.....	38
<b>5.2 Ensaio de potência – Analista 2.....</b>	<b>39</b>
5.2.1 Cálculo das potências das vacinas.....	41
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXO A – CALENDÁRIO NACIONAL DE VACINAÇÃO / ANO 2018.....</b>	<b>51</b>

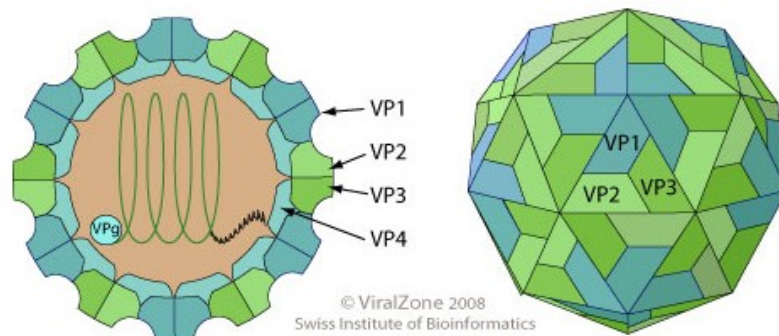
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Poliomielite: agente etiológico, transmissão e manifestações clínicas da doença

A poliomielite, também chamada de paralisia infantil, é uma doença infectocontagiosa viral aguda, causada por poliovírus pertencentes ao gênero *Enterovirus*, à família *Picornaviridae*, e subdivididos em três sorotipos imunologicamente distintos e patogênicos ao homem: sorotipos 1, 2 e 3 (BRASIL, 2016).

O poliovírus consiste num capsídeo de simetria icosaédrica, não envelopado, medindo de 22–30 nm de diâmetro e sem projeções. O capsídeo é formado por 60 subunidades idênticas (protômeros), cada uma composta por quatro proteínas, sendo as proteínas VP1, VP2 e VP3 organizadas à superfície da partícula e a proteína VP4 voltada para o seu interior (associada ao genoma viral), como mostra a Figura 1. O genoma é composto de uma molécula de ácido ribonucleíco (RNA) de fita simples, linear, com polaridade positiva (+ssRNA) e contendo, aproximadamente, 7.400 nucleotídeos. O RNA viral é infeccioso, tendo função tanto de RNA genômico quanto de RNA mensageiro (RNAm) (EVANS; KASLOW, 1997; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Figura 1 – Estrutura esquemática do poliovírus.



Fonte: (VIRALZONE, 2008).

O vírus da poliomielite é um patógeno exclusivamente humano, sendo as crianças com idade inferior a quatro anos as principais afetadas pela doença. No entanto, ela também pode surgir em adultos não vacinados. Sua transmissão se dá de forma direta – pessoa a pessoa –, principalmente pela via fecal-oral, isto é, através de água, alimentos e objetos contaminados

com fezes de doentes ou portadores. Deste modo, a falta de saneamento básico, condições precárias de higiene pessoal e as más condições habitacionais constituem fatores favoráveis à transmissão do vírus. Em menor proporção, o poliovírus também pode ser transmitido pela via oral-oral, através das secreções nasofaríngeas expelidas ao falar, tossir ou espirrar (BRASIL, 2016; DURANTE; POZ, 2014).

Os poliovírus se multiplicam no intestino, de onde alcançam a corrente sanguínea e invadem o sistema nervoso central (SNC). A poliomielite caracteriza-se por um quadro de paralisia flácida, de início súbito, que ocorre em cerca de 1 a 2% das infecções causadas pelo poliovírus. No entanto, a grande maioria dos casos é assintomática ou exibe sintomas brandos, tais como cefaleia, febre, dor de garganta, náusea e vômitos (BRASIL, 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). O período de incubação do poliovírus é geralmente de 7 a 12 dias após a infecção, podendo variar de 2 a 30 dias, tanto nos casos clínicos quanto nas formas assintomáticas. Cerca de 36 a 72 horas após a infecção, o vírus já pode ser encontrado nas secreções do trato respiratório superior, e sua eliminação pela orofaringe persiste por um período de aproximadamente uma semana, enquanto que a eliminação pelas fezes persiste por cerca de três a seis semanas (BRASIL, 2016).

A poliomielite pode manifestar-se das seguintes maneiras:

- Infecção inaparente ou assintomática – cerca de 90 a 95% dos casos são subclínicos e imperceptíveis, sendo identificados apenas por exames laboratoriais específicos;
- Forma abortiva ou doença menor – ocorre em cerca de 4 a 8% dos casos e caracteriza-se por um quadro inespecífico, cujos sintomas incluem: febre, cefaleia, anorexia, dor de garganta, e sintomas gastrointestinais, como vômito, dores abdominais e diarreia. Tem duração de dois a três dias e, assim como na forma inaparente, o diagnóstico só é possível por meio do isolamento do vírus;
- Meningite asséptica – ocorre em cerca de 1% das infecções. Inicialmente, produz os mesmos sintomas da forma abortiva, que evoluem para sinais de irritação meníngea (sinais de Kernig e Brudzinski positivos), espasmos musculares e rigidez da nuca;
- Forma paralítica – é a forma mais grave da doença, que acomete cerca de 1 a 2% dos infectados. Neste caso, os vírus infectam os neurônios motores das células do corno anterior da medula espinhal, lesionando ou destruindo estas células. As características clínicas são típicas, que permitem sugerir o diagnóstico da doença, e incluem: (a) febre e dores musculares; (b) paralisia flácida de início súbito, normalmente nos membros inferiores e de forma assimétrica; (c) diminuição ou abolição de reflexos profundos na



área paralisada; (d) sensibilidade preservada; e (e) persistência de alguma paralisia residual após 60 dias do início da doença (BRASIL, 2016; DURANTE; POZ, 2014; GARON; COCHI; ORENSTEIN, 2015; NASCIMENTO, 2004).

A intensidade e a gravidade do quadro clínico dependem do número de neurônios motores atingidos, bem como da idade do indivíduo infectado (NASCIMENTO, 2004). Nos casos de paralisia severa ou total, os músculos afetados dificilmente recuperam a capacidade funcional, originando sequelas graves. Já nos casos de paralisia leve, a reversão é possível e os pacientes tendem a recuperar suas funções. As taxas de letalidade variam entre 5 e 10%, sendo maiores em adultos do que em crianças. As mortes estão associadas à insuficiência respiratória, que ocorre quando os músculos respiratórios são atingidos (DURANTE; POZ, 2014; GARON; COCHI; ORENSTEIN, 2015; NASCIMENTO, 2004).

O diagnóstico diferencial se faz necessário devido ao grande número de patologias que também causam paralisia, tais como síndrome de Guillain-Barré, mielite transversa, meningite viral, meningoencefalite e infecções por outros enterovírus (BRASIL, 2010). A poliomielite é uma doença que não possui tratamento específico, entretanto, todos os casos com manifestações clínicas devem ser hospitalizados para receberem tratamento de suporte (BRASIL, 2010).

## **1.2 Aspectos históricos e epidemiológicos**

A primeira descrição clínica da poliomielite se deu em 1789, quando o médico britânico Michael Underwood relatou observar uma doença que parecia atingir principalmente crianças, deixando-as com uma debilidade residual nas extremidades inferiores (DE JESUS, 2007). No final do século XIX, diversos países do mundo começaram a registrar epidemias desta doença, fazendo com que ela passasse a ser reconhecida como um problema de saúde pública. Em 1908, os médicos austríacos Karl Landsteiner e Erwin Popper conseguiram isolar o poliovírus a partir de macacos, descobrindo e identificando, assim, o agente causador da doença (CAMPOS; NASCIMENTO; MARANHÃO, 2003; DURANTE; POZ, 2014).

No Brasil, os primeiros casos esporádicos de poliomielite foram registrados no início de 1911, na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e no Hospital Misericórdia do Rio de Janeiro. No entanto, a primeira descrição de um surto no país foi feita pelo pediatra carioca Fernandes Figueira, também em 1911. Alguns anos depois, em 1917, foi registrado mais um surto da doença em Vila Americana, no estado de São Paulo. Como resultado da epidemia de

1917, a poliomielite passou a ser uma doença de notificação compulsória em todo o território paulista (CAMPOS; NASCIMENTO; MARANHÃO, 2003; DURANTE; POZ, 2014).

A maior epidemia até então registrada no país ocorreu em 1953, no Rio de Janeiro. Nesta mesma época, os avanços científicos na área da microscopia eletrônica, bem como os êxitos obtidos com o cultivo *in vitro* do poliovírus, tornavam real a possibilidade de se desenvolver uma vacina contra a poliomielite (CAMPOS; NASCIMENTO; MARANHÃO, 2003). Nas décadas seguintes, com o advento da vacinação e com os esforços mundiais para combater a doença, os casos foram diminuindo massivamente na maioria dos países.

Em 1988, a poliomielite era endêmica em 125 países. Tal fato levou à 41ª Assembleia Mundial da Saúde a adotar uma resolução histórica para a erradicação mundial desta doença. Deste modo, foi lançada a Iniciativa Global para a Erradicação da Poliomielite (*Global Polio Eradication Initiative* – GPEI, em inglês), que reunia ações e estratégias bem definidas para alcançar tal objetivo. Desde a criação da GPEI, o número de casos de poliomielite diminuiu mais de 99%, e o número de países onde a doença é endêmica passou de 125 para apenas dois: Paquistão e Afeganistão (BRASIL, 2015; DURANTE; POZ, 2014).

No Brasil, a poliomielite apresentou elevada incidência até o início da década de 1980. Nesta mesma época, iniciaram-se as campanhas de vacinação em massa e a vacinação de rotina das crianças, que, aliadas às ações de vigilância epidemiológica, foram fatores decisivos para a eliminação da doença no país (BRASIL, 2016). O último caso de infecção pelo poliovírus selvagem foi registrado em 1989, no estado da Paraíba (DURANTE; POZ, 2014). Poucos anos depois, em 1994, após três anos de ausência da circulação do poliovírus no continente americano, a Organização Pan-Americana de Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS) certificou esta região como a primeira do mundo livre da transmissão autóctone do poliovírus selvagem (BRASIL, 2016).

Atualmente, a poliomielite afeta um número reduzido de crianças ao redor do mundo. Além do continente americano, as regiões do Pacífico Ocidental, Europa e Sudeste Asiático também já foram declaradas livres desta doença. Apenas o continente africano e a região do Mediterrâneo Oriental têm registrado casos de infecção causados pelo poliovírus selvagem e, mesmo assim, os casos vêm diminuindo a cada ano, como mostra a Tabela 1. No entanto, apesar de eliminada na maioria dos países, a poliomielite permanece como uma doença de interesse político e sanitário internacional, devido ao seu potencial epidêmico. A migração e a circulação de pessoas podem colaborar para a exportação do poliovírus de regiões endêmicas para regiões livres da doença (BRASIL, 2015; DURANTE; POZ, 2014). Sendo assim, para evitar a reintrodução da poliomielite nessas áreas, é necessária a manutenção de uma

vigilância efetiva e permanente, bem como níveis satisfatórios de proteção imunológica da população (BRASIL, 2016).

Tabela 1 – Casos de poliomielite causados por poliovírus selvagem, de 2013 a 2017, divididos pelas seis regiões da OMS.

	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>
África	80	17	0	4	0
Américas	0	0	0	0	0
Europa	0	0	0	0	0
Mediterrâneo Oriental	336	342	74	33	20
Pacífico Ocidental	0	0	0	0	0
Sudeste Asiático	0	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>416</b>	<b>359</b>	<b>74</b>	<b>37</b>	<b>20</b>

Fonte: (Adaptado de ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

### 1.3 Programa Nacional de Imunizações

No Brasil, vacinas são utilizadas como medida de controle de doenças desde o início do século XIX. Até 1970, em termos nacionais, as atividades de imunização eram realizadas de forma assistemática, intensificando-se apenas quando eram detectados surtos epidêmicos. Em 1973, no entanto, foi criado o Programa Nacional de Imunizações (PNI), cuja missão era organizar e coordenar as ações de vacinação no país (DOMINGUES; TEIXEIRA, 2013; NASCIMENTO, 2004).

Ao ser implementado, o PNI introduziu a multivacinação, objetivando estimular e expandir a utilização de agentes imunizantes no país, como proposta de redução da morbidade e mortalidade por doenças imunopreveníveis (CAMPOS; NASCIMENTO; MARANHÃO, 2003). Dentre os benefícios alcançados com a criação do programa, pode-se citar: (a) a uniformidade do calendário vacinal; (b) a padronização técnica; (c) a introdução sustentável de novas vacinas; e (d) a adoção de estratégias inovadoras, como a combinação da vacinação de rotina com as campanhas de vacinação. Estes fatores tiveram papel essencial na eliminação de doenças como o sarampo, a poliomielite e a rubéola (SILVA JÚNIOR, 2013).

O Brasil é um dos países que oferecem o maior número de imunobiológicos, de forma gratuita, aos grupos populacionais-alvo. O PNI conta com amplos calendários de vacinação, divididos por faixas etárias: calendário da criança, do adolescente, do adulto e do idoso, como mostrado no ANEXO A. Além destes, existem calendários vacinais que atendem a grupos especiais e portadores de condições clínicas específicas, tais como gestantes, povos indígenas, pessoas em tratamento contra o câncer, pacientes crônicos, entre outros. Além das vacinas, também são disponibilizados soros e imunoglobulinas. O PNI também realiza a vigilância de eventos adversos às vacinas, assim como estudos avaliativos do impacto das mesmas na morbimortalidade. Com isso, consegue-se garantir a oferta de imunobiológicos de qualidade à população brasileira (DOMINGUES; TEIXEIRA, 2013; SILVA JÚNIOR, 2013).

#### **1.4 Vacinas contra a poliomielite**

A época áurea do desenvolvimento de vacinas iniciou-se em 1949, quando Enders e colaboradores publicaram um artigo na revista científica *Science* descrevendo o cultivo e a propagação do poliovírus em culturas de tecido humano. Com a novidade das técnicas de cultivo *in vitro*, desenvolver uma prevenção contra a poliomielite tornou-se uma possibilidade real, e diversos laboratórios começaram a trabalhar nesta área (CAMPOS; NASCIMENTO; MARANHÃO, 2003).

Na década de 1950, existiam duas abordagens diferentes para o desenvolvimento de uma vacina contra a poliomielite. Em 1954, Salk e Younger produziram com sucesso uma vacina por inativação química do vírus propagado em cultura de células usando formaldeído. Tal vacina se mostrou capaz de induzir uma resposta imune protetora contra a doença. Neste mesmo período, três grupos de pesquisadores trabalhavam no desenvolvimento de uma vacina viva e atenuada contra a poliomielite. Em 1961, após extensas pesquisas de campo na antiga União Soviética, Europa Oriental e América Latina, as cepas de Sabin foram licenciadas nos Estados Unidos. A partir daí, duas vacinas seguras e eficazes contra a poliomielite tornaram-se disponíveis para uso geral: a Salk, injetável e composta de vírus inativado; e a Sabin, de uso oral e composta de vírus atenuado (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004).

##### **1.4.1 Vacina Salk ou Vacina Inativada Poliomielite (VIP)**

A vacina Salk, também conhecida como vacina inativada poliomielite (VIP), é uma vacina trivalente, injetável e composta por poliovírus mortos. Ela é desenvolvida em culturas

de células diploides humanas concentradas, purificadas e inativadas por formaldeído. Uma formulação mais recente e mais antigênica, desenvolvida em 1978 e conhecida como VIP de Potência Aumentada, utiliza cepas selecionadas de poliovírus cultivadas em culturas de células VERO (células epiteliais de rim de macaco-verde africano), que posteriormente são concentradas, purificadas e inativadas por formaldeído (NASCIMENTO, 2004).

A mistura final da vacina VIP contém 40, 8 e 32 unidades de antígeno-D para os sorotipos 1, 2 e 3, respectivamente. Sua apresentação pode ser sob a forma isolada (previne somente contra a poliomielite) ou sob a forma combinada com outras vacinas, tais como a vacina pentavalente (vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis / VIP / *Haemophilus influenzae* tipo b – DTP-VIP/Hib) e a vacina hexavalente (vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis / VIP / hepatite B / *H. influenzae* tipo b – DTP-VIP-HB/Hib), que imunizam contra difteria, tétano, coqueluche, poliomielite, hepatite B e meningite causada por *H. influenzae* tipo b (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010; SBIM, 2018).

A VIP é administrada por via intramuscular ou subcutânea, sendo capaz de induzir uma forte resposta imune nos indivíduos vacinados. Após três doses da vacina, observam-se taxas de soroconversão próximas a 100% e elevados títulos de anticorpos para os três sorotipos presentes na formulação. Com duas doses, as taxas de soroconversão são superiores a 90%. A imunogenicidade, portanto, depende do número de doses administradas, bem como da idade do indivíduo (GARON; COCHI; ORENSTEIN, 2015). O esquema vacinal usando a VIP consiste na aplicação de três doses, administradas no primeiro semestre de vida (em crianças a partir dos dois meses de idade), com intervalo de 60 dias entre cada dose, e doses de reforço entre 15 e 18 meses e entre quatro e cinco anos de idade (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010).

A imunidade desenvolvida pela VIP é essencialmente do tipo humoral e leva a altos níveis de proteção individual, ou seja, protege apenas o indivíduo vacinado. A VIP, por ser injetável, não é capaz de induzir imunidade de mucosa intestinal, não havendo imunização secundária entre contatos. Em compensação, não existe o risco de geração de cepas virais mutantes, capazes de produzir casos de paralisia associada à vacina. Por este motivo, sua administração em indivíduos imunocomprometidos é segura. Além disso, a VIP é efetiva na diminuição da replicação do poliovírus na faringe, reduzindo os casos de transmissão do vírus pela via oral-oral (CARVALHO; WECKX, 2006; GARON; COCHI; ORENSTEIN, 2015; NASCIMENTO, 2004).

A VIP é considerada uma vacina segura, sendo poucos os eventos adversos associados ao seu uso. Podem ocorrer eritema discreto no local da injeção, endurecimento e dor leve,

além de febre moderada. Reações de hipersensibilidade podem ser observadas em indivíduos sensíveis aos antibióticos presentes na formulação (estreptomicina, neomicina e polimixina B). Por ser uma vacina injetável, seu custo é mais elevado, uma vez que requer material adequado e pessoal qualificado para sua aplicação (GARON; COCHI; ORENSTEIN, 2015; NASCIMENTO, 2004).

#### 1.4.2 Vacina Sabin ou Vacina Oral Poliomielite (VOP)

A vacina Sabin, também conhecida como vacina oral poliomielite (VOP), é uma vacina composta por poliovírus vivos atenuados e de administração oral. As cepas de vírus atenuados são obtidas após passagens em série de cepas selvagens a uma multiplicidade de infecção alta (várias partículas virais por célula), usando culturas de células VERO. Com este processo, a virulência dos poliovírus é reduzida a níveis considerados seguros para sua aplicação clínica. As cepas atenuadas possuem as seguintes características: (a) capacidade para replicar efetivamente no trato gastrointestinal; (b) falta de capacidade para invadir ou replicar no interior do SNC; e (c) estabilidade genética para suportar as pressões de replicação no hospedeiro humano sem reversão para o fenótipo neurovirulento (DE JESUS, 2007).

A vacina VOP pode apresentar-se sob diferentes formas: vacina trivalente (VOPt), que contém os sorotipos 1, 2 e 3; vacina bivalente (VOPb), que contém os sorotipos 1 e 3; e vacina monovalente, para o sorotipo 1 (VOP1m) e sorotipo 3 (VOP3m) (GARON; COCHI; ORENSTEIN, 2015). A administração oral da VOP mimetiza a infecção causada pela exposição natural ao poliovírus selvagem, induzindo imunidade tanto local (em nível de mucosa) quanto humoral. Além da imunidade produzida, o vírus vacinal compete com o vírus selvagem pela ocupação dos sítios de acoplamento na luz intestinal, o que é de grande eficácia no bloqueio de surtos. Os vírus vacinais que colonizam o intestino são excretados nas fezes e podem infectar secundariamente contatos suscetíveis (não vacinados), induzindo imunidade nestes. Esta capacidade de disseminação das cepas atenuadas contribui para uma taxa maior de imunização do que a fornecida pela cobertura vacinal. Em países onde a transmissão via fecal-oral é predominante – países em desenvolvimento –, o uso da VOP nas campanhas de vacinação em massa constitui uma boa estratégia para ampliar o alcance da imunização e colaborar para a eliminação da doença (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2015; CARVALHO; WECKX, 2006).

Em países desenvolvidos, as taxas de soroconversão para os três sorotipos presentes na VOPt são de quase 100% após três doses da vacina, enquanto que países em desenvolvimento

geralmente apresentam taxas de anticorpos detectáveis bem inferiores, principalmente para os sorotipos 1 e 3. Estudos recentes evidenciaram taxas médias de 73% para o sorotipo 1, 90% para o sorotipo 2 e 70% para o sorotipo 3. Dados destes estudos sugerem que o componente de tipo 2, bem como a coinfeção com outros enterovírus no momento da imunização, podem interferir nas respostas aos sorotipos 1 e 3. Neste caso, há a necessidade de doses adicionais da vacina para a soroconversão para os três sorotipos (CIAPPONI *et al.*, 2014; GARON; COCHI; ORENSTEIN, 2015).

Além de induzir imunidade de longa duração nos indivíduos vacinados e da capacidade de induzir imunidade secundária em indivíduos suscetíveis, a VOP possui baixo custo e é facilmente administrada (gotas), não exigindo pessoal qualificado e/ou instrumentação especial. Por estes motivos, a OMS a elegeu como o pilar da erradicação da poliomielite (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2015; DE JESUS, 2007). Desde que começou a ser usada nas campanhas de vacinação, a VOP já conseguiu erradicar globalmente o poliovírus selvagem tipo 2, eliminar os poliovírus selvagens tipo 1 e tipo 3 em quatro das seis regiões da OMS, além de reduzir em mais de 99% os casos nas duas regiões restantes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

Embora os benefícios da VOP sejam bastante conhecidos, existem riscos associados ao seu uso. Durante a replicação, os vírus vacinais podem sofrer mutação reversa com aumento da neurovirulência, podendo causar raros casos de paralisia associada à vacina (*vaccine-associated paralytic poliomyelitis* – VAPP, em inglês). Se, além da neurovirulência, os vírus também readquirirem a transmissibilidade, como ocorre com o poliovírus circulante derivado da vacina (*circulating vaccine-derived poliovirus* – cVDPV, em inglês), surtos de VAPP podem ocorrer (CARVALHO; WECKX, 2006).

A VAPP é clinicamente semelhante à paralisia causada pelo poliovírus selvagem, e o risco dela se desenvolver é substancialmente maior na primeira dose de VOP do que em doses subsequentes. Nos imunossuprimidos, esse risco é mais elevado, cerca de 3.200 vezes maior do que em imunocompetentes. Para que o caso de paralisia seja considerado associado à vacina, faz-se necessário o isolamento, a análise e o sequenciamento dos vírus encontrados em amostras fecais e/ou ambientais. Os cVDPV são formas geneticamente divergentes dos poliovírus que compõem a vacina, caracterizados por >1% de diferença genética para os sorotipos 1 e 3 e >0,6% de divergência para o sorotipo 2 (CARVALHO; WECKX, 2006; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). O principal fator de risco para os surtos de cVDPV é a baixa imunidade da população. Assim, as regiões mais afetadas são aquelas com baixos índices de cobertura vacinal e/ou que apresentam condições epidemiológicas

favoráveis à transmissão do vírus, tais como baixo status socioeconômico, condições precárias de saneamento, aglomerações de pessoas, entre outros (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2015).

## 1.5 Erradicação da poliomielite

A erradicação da poliomielite é uma prioridade mundial de saúde. Os esforços globais ao longo das últimas décadas resultaram em uma redução drástica dos casos da doença, de cerca de 350.000 casos em 1988 para apenas 20 casos em 2017. Tal sucesso foi alcançado através do uso massivo da VO<sub>Pt</sub> nas campanhas de vacinação, o que reduziu fortemente a transmissão dos três tipos de poliovírus selvagem. O poliovírus selvagem tipo 2 foi isolado pela última vez em outubro de 1999, na Índia, e foi declarado erradicado em setembro de 2015. O poliovírus selvagem tipo 3, por sua vez, encontra-se controlado, não sendo detectado desde novembro de 2012. Portanto, o poliovírus selvagem tipo 1 é, provavelmente, o único que permanece em circulação (HAMPTON *et al.*, 2016; PATEL; ORENSTEIN, 2016).

O poliovírus tipo 2 atualmente existe apenas em laboratórios e na formulação da VO<sub>Pt</sub>, na forma atenuada, embora em raras ocasiões se encontre na comunidade, sob a forma de surtos de vírus derivados da vacina. Nos últimos anos, ele foi o responsável por mais de 95% dos surtos de cVDPV e cerca de 30% dos casos de VAPP detectados, o que torna urgente a descontinuação do uso da vacina atenuada. Como os poliovírus selvagens tipo 1 e 3 ainda não foram declarados erradicados, a retirada dos antígenos deve ser gradual (começando pelo sorotipo 2), através da substituição da VO<sub>Pt</sub> pela VO<sub>Pb</sub> (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2015; PATEL; ORENSTEIN, 2016).

### 1.5.1 Plano estratégico final: mudança da VO<sub>Pt</sub> para a VO<sub>Pb</sub>

De acordo com o plano estratégico, a mudança da VO<sub>Pt</sub> para a VO<sub>Pb</sub> deveria ocorrer de forma sincronizada globalmente, durante uma janela de duas semanas, a fim de minimizar os riscos de geração e importação de cVDPV a partir de regiões de uso contínuo da vacina trivalente. Além disso, para complementar a troca e reduzir os riscos relacionados às lacunas de imunidade contra o sorotipo 2, a OMS recomendou a introdução de, pelo menos, uma dose da VIP nos programas de imunização de países que utilizavam apenas a vacina oral (PATEL *et al.*, 2015). Em maio de 2016, todos os 155 países que ainda usavam a vacina atenuada nos seus programas de vacinação em 2015 relataram a interrupção do uso da VO<sub>Pt</sub> e, em agosto



do mesmo ano, 173 (89%) dos 194 países membros da OMS já tinham incluído a vacina VIP nas suas rotinas de imunização (HAMPTON *et al.*, 2016).

A VIP é a vacina de escolha na era pós-erradicação, e a sua introdução integra um plano de transição que objetiva aumentar a utilização da vacina inativada e diminuir o uso da vacina atenuada, combinando, assim, as vantagens de ambas e reduzindo os riscos de ocorrência de surtos de VAPP (NASCIMENTO, 2004).

No Brasil, o processo de introdução da VIP iniciou-se em 2012, com a adoção do esquema sequencial VIP/VOP. Neste esquema, as crianças passaram a receber duas doses de VIP (aos dois e quatro meses de idade), uma dose de VOPt (aos seis meses) e dois reforços com VOPt (aos 15 meses e aos quatro anos de idade). A partir de agosto de 2016, com a interrupção global do uso da vacina oral trivalente, houve mudanças no esquema vacinal, que passou a compreender três doses de VIP (aos dois, quatro e seis meses de idade) e dois reforços com VOPb (aos 15 meses e aos quatro anos de idade) (BRASIL, 2015). A Tabela 2 resume as alterações no esquema de vacinação após a substituição da VOPt pela VOPb, em 2016.

Tabela 2 – Mudanças no esquema vacinal VIP/VOP após a interrupção do uso da VOPt, em 2016.

<b>Esquema Vacinal VIP/VOP</b>		
<b>Idade</b>	<b>2012</b>	<b>2016</b>
<b>2 meses</b>	VIP	VIP
<b>4 meses</b>	VIP	VIP
<b>6 meses</b>	VOPt	VIP
<b>15 meses</b>	VOPt	VOPb
<b>4 anos</b>	VOPt	VOPb

Fonte: (Do autor, 2017); (Adaptado de BRASIL, 2015).

A erradicação global da poliomielite, além de proteger as futuras gerações contra os efeitos devastadores desta doença, proporcionará enormes benefícios econômicos, já que os gastos mundiais em saúde pública serão reduzidos (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2015).

## 1.6 Controle da qualidade dos imunobiológicos adquiridos pelo PNI

O fortalecimento das campanhas de vacinação levou o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), a analisar, a partir de 1983, os lotes de imunobiológicos adquiridos pelo PNI. Desta maneira, eram garantidas a qualidade e a segurança dos produtos distribuídos pelo programa (ALMEIDA, 2014).

Os imunobiológicos contemplados pelo PNI são encaminhados ao INCQS, onde são feitas análises laboratoriais e documentais dos mesmos, antes da liberação dos lotes para uso pela população. Os testes laboratoriais realizados nas vacinas, de um modo geral, avaliam sua eficácia (ensaios de identidade, estabilidade e potência) e segurança (testes de esterilidade, toxicidade e endotoxina bacteriana). A análise documental – análise do protocolo resumido de produção e controle – consiste na verificação dos procedimentos de produção e do controle de qualidade das diversas etapas da produção, do lote final e das matérias-primas (CARVALHO, 2014; NETTO, 2010).

### 1.6.1 Ensaios de potência das vacinas

A estimativa da potência das vacinas consiste na avaliação do seu potencial de indução de imunidade protetora pós-administração. Existem diferenças fundamentais no delineamento de ensaios para vacinas vivas e inativadas. A eficácia das vacinas atenuadas está relacionada ao número de partículas vivas, que pode ser determinado por contagem ou titulação, sendo um método essencialmente *in vitro* (METZ *et al.*, 2002).

No caso da vacina atenuada contra a poliomielite, o ensaio de potência determina os conteúdos de vírus total e de cada um dos sorotipos presentes na formulação, através de um teste *in vitro* que utiliza células da linhagem contínua Hep-2C (células epiteliais derivadas de carcinoma de laringe humano). O ensaio é avaliado por meio da presença ou ausência de efeito citopático nas culturas celulares, isto é, alterações morfológicas causadas pela presença dos vírus, sendo o título viral expresso em  $\log_{10}$  CCID<sub>50</sub> (50% cell culture infectious dose – em inglês, ou dose infectante de 50% da cultura celular) por dose. Em cada ensaio realizado deve-se incluir um lote da vacina de Referência de Trabalho, cuja potência tenha sido previamente estabelecida, a fim de controlar a precisão e a reprodutibilidade do sistema de ensaios (SANTOS *et al.*, 2011).

### 1.6.2 Uso de culturas de células em ensaios biológicos

A possibilidade de se cultivar células e/ou tecidos em laboratório tornou-se um recurso valioso tanto para a pesquisa biomédica como para a área de biotecnologia industrial. Células em cultura constituem modelos biológicos menos complexos do que os modelos que utilizam animais de experimentação e, por isso, tendem a fornecer respostas mais simplificadas, porém suficientemente informativas, para os problemas de investigação científica (MIGITA, 2012).

Existem diversas aplicações para as culturas celulares. Na área da pesquisa básica, as células podem ser empregadas em estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares; na área da virologia, são muito usadas para a obtenção viral e para fins de diagnóstico de doenças; e na área da biotecnologia, são utilizadas na produção de imunobiológicos, tais como vacinas e anticorpos monoclonais (MIGITA, 2012).

O emprego de culturas celulares em ensaios biológicos demanda conhecimento prévio das particularidades de cada linhagem. Como parte da garantia da qualidade dos resultados de ensaios *in vitro*, as células usadas devem ser adequadas aos propósitos da experimentação e devem ser cultivadas em condições ideais. É essencial que sejam adquiridas de fontes oficiais, tais como a Coleção Americana de Culturas de Células (*American Type Culture Collection – ATCC*, em inglês) ou a Coleção Europeia de Culturas de Células Autenticadas (*European Collection of Authenticated Cell Cultures – ECACC*, em inglês). Além disso, deve-se realizar um monitoramento periódico das culturas em uso, já que existe o risco de contaminação cruzada por outros tipos de células e/ou microrganismos após a manipulação. As condições de cultivo devem ser controladas, ou seja, deve-se usar um meio ou substrato que forneça os nutrientes necessários às células (aminoácidos, proteínas, vitaminas, sais minerais, lipídeos, etc.), além da manutenção de um ambiente físico-químico ideal (temperatura, pH e umidade adequados) (KASVI, 2018; MIGITA, 2012).

## 2 JUSTIFICATIVA

A vacinação é uma das medidas mais importantes e eficazes de prevenção de doenças infecciosas. O uso de vacinas contribui para a redução das taxas de mortalidade associada a doenças, melhora a qualidade de vida da população e diminui significativamente os gastos em saúde pública para a sociedade. Devido à vacinação, doenças como a varíola, o sarampo e a poliomielite já foram ou estão em processo de erradicação (MCVEY; GALVIN; OLSON, 2003). No caso da poliomielite, o plano final para a sua erradicação reafirma o compromisso mundial para a eliminação dos três tipos de poliovírus, através da adoção de estratégias como a manutenção de elevados índices de cobertura vacinal e ações de vigilância epidemiológica, ambiental e de contenção laboratorial (BRASIL, 2015).

No Brasil, tanto a VOPb quanto a VIP estão incluídas no calendário de vacinação do PNI, sendo oferecidas gratuitamente à população. A fim de garantir a segurança e a eficácia das vacinas, foram criadas diretrizes que servem para padronizar as especificações e as certificações de matérias-primas, processos de fabricação e testes de controle de qualidade (BRASIL, 2015; MCVEY; GALVIN; OLSON, 2003).

Neste contexto, o INCQS desempenha papel fundamental na garantia da qualidade das vacinas, uma vez que é o órgão responsável pelas análises de todos os lotes produzidos no país. No Departamento de Imunologia (DI), o Laboratório de Vacinas Virais, Biofármacos e Cultura de Células (LVV/CC) realiza dois ensaios para avaliar a eficácia da vacina atenuada contra a poliomielite: ensaio de potência e ensaio de termoestabilidade. O ensaio de potência consiste na avaliação da infectividade, em culturas de células, dos vírus presentes na vacina. Em cada ensaio, uma vacina de Referência de Trabalho deve ser testada paralelamente às vacinas em análise, a fim de aumentar a padronização do ensaio e minimizar os desvios, sendo peça crítica na interpretação dos resultados (ALMEIDA, 2014; SANTOS, 2010).

Assim, a relevância deste trabalho fundamenta-se no fato de que, para a manutenção deste processo, um novo lote de vacina de Referência de Trabalho deve ser eleito antes do término do lote atualmente em uso (lote comercial da VOPb, com validade de dois anos). Para tanto, o processo de seleção deve ser conduzido de forma que o novo lote eleito apresente bom desempenho e satisfaça os critérios de aprovação para o seu uso contínuo na rotina de ensaios de potência.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Qualificar um lote da VOPb para ser usado como vacina de Referência de Trabalho na rotina de ensaios de potência da vacina bivalente realizados pelo LVV/CC, do DI, do INCQS.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- 1- Selecionar um lote da VOPb candidato à vacina de Referência de Trabalho;
- 2- Estimar o título do lote candidato através de ensaios de potência padronizados e aprovados pelo LVV/CC, frente ao lote de VOPb atualmente eleito pelo laboratório como vacina de Referência de Trabalho;
- 3- Usar ferramentas estatísticas adequadas para verificar se o lote candidato atende aos requisitos preconizados para uso na rotina de ensaios de potência do laboratório.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Lote candidato à vacina de Referência de Trabalho – lote A

Foi selecionado um lote da VOPb candidato à vacina de Referência de Trabalho, com base na análise documental dos resultados apresentados no protocolo resumido de produção e controle do produto. O lote apresenta-se sob a forma de um cartucho de papelão, contendo 50 bisnagas de plástico em seu interior. Cada bisnaga contém 2,5 mL da vacina em solução, o que corresponde a 25 doses (cada dose equivale a 0,1 mL ou duas gotas).

A vacina bivalente consiste numa solução oral de coloração rósea, límpida e isenta de partículas visíveis, composta por poliovírus vivos atenuados (sorotipos 1 e 3). Os excipientes da formulação são: água destilada, cloreto de magnésio, eritromicina, estreptomicina, L-arginina e polissorbato 80.

O lote candidato foi produzido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos / Fiocruz) e recebeu a seguinte codificação: lote A. O cartucho encontrava-se dentro do prazo de validade e foi armazenado de acordo com as recomendações do produtor.

### 4.2 Vacina de Referência de Trabalho atual – lote B

A vacina de Referência de Trabalho em uso consiste num lote comercial da VOPb, com validade de dois anos a partir da data de fabricação, cuja potência foi validada através de ensaios realizados no LVV/CC, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3 – Valores da validação da potência da vacina de Referência de Trabalho em uso.

<b>Vacina de Referência de Trabalho Atual</b>			
<b>Sorotipo</b>	<b>Título (log<sub>10</sub>)</b>	<b>Limite Inferior (log<sub>10</sub>)</b>	<b>Limite Superior (log<sub>10</sub>)</b>
<b>1</b>	6,40	6,17	6,64
<b>3</b>	5,96	5,69	6,24
<b>Bivalente</b>	6,41	6,07	6,75

Fonte: (Do autor, 2017).

Este lote possui a mesma apresentação do lote candidato descrito no Item 4.1, o mesmo aspecto, os mesmos excipientes e também foi produzido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos / Fiocruz), recebendo a seguinte codificação: lote B. O cartucho contendo as bisnagas encontrava-se dentro do prazo de validade e foi armazenado de acordo com as recomendações do produtor.

Os valores obtidos estão de acordo com as especificações da Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, volume II (ANVISA, 2010), como mostrado na Tabela 4. O lote de Referência de Trabalho – que possui títulos (potências para os sorotipos 1 e 3 e vírus totais) e limites de confiança superiores e inferiores aprovados de acordo com as especificações para o ensaio – é usado para validar os ensaios feitos com o lote candidato à nova Referência de Trabalho.

Tabela 4 – Critérios para a aprovação do ensaio de potência da vacina bivalente.

<b>Vírus Titulado</b>	<b>Potência <math>\log_{10}</math> CCID<sub>50</sub> / dose humana</b>
Poliovírus Tipo 1	$\geq 6,00$
Poliovírus Tipo 3	$\geq 5,78$

Fonte: (Do autor, 2017); (Adaptado de ANVISA, 2010).

### 4.3 Determinação da potência das vacinas

O ensaio de potência fundamenta-se na quantificação da infectividade, em culturas de células, dos componentes virais presentes na vacina bivalente (vírus totais e sorotipos 1 e 3), expressos em CCID<sub>50</sub> por dose humana. As etapas do ensaio seguem protocolo estabelecido no Procedimento Operacional Padronizado (POP) nº 65.3430.002, do LVV/CC, do DI, do INCQS (INCQS, 2015a), e serão descritas a seguir.

#### 4.3.1 Culturas de células

Para a realização dos ensaios de potência, foram utilizadas culturas de células de linhagens contínuas Hep-2C, cuja manutenção, preparo e fornecimento seguem protocolos

estabelecidos nos POPs nº 65.3430.008 e 65.3430.031, do Setor de Cultura de Células do LVV/CC, do DI, do INCQS (INCQS, 2015b, 2016).

A ampola semente da linhagem Hep-2C foi adquirida do acervo da ECACC e mantida no acervo do Setor de Cultura de Células. A partir desta ampola, foram produzidos lotes de células-mestre (LM), que foram usados para a produção de lotes de células de trabalho (LT). Os LT constituem o estoque de células utilizadas na rotina de ensaios realizados no INCQS. As culturas celulares foram usadas por até 15 passagens após o descongelamento das ampolas do LT.

#### 4.3.2 Preparo e fornecimento da suspensão celular Hep-2C

A suspensão celular foi preparada e fornecida sempre no dia da realização de cada ensaio. As células foram fornecidas em meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) | Sigma-Aldrich, concentração 1X, previamente filtrado com solução de bicarbonato de sódio 7,5% (p/v) para ajuste do pH, e suplementado com 3% de soro fetal bovino, 2,5% de tampão HEPES 1M, 1,5% de solução de L-glutamina 200 mM, 1% de solução de anfotericina B 0,025% (p/v) e 1% de solução de penicilina G sódica + sulfato de estreptomicina (10.000 UI/mL + 10.000 µg/mL). A suspensão celular foi fornecida em erlenmeyer na concentração final de  $2,0 \times 10^5 \pm 0,4$  células/mL.

#### 4.3.3 Preparo dos antissoros

Com o objetivo de eliminar a interferência entre os sorotipos presentes na formulação e permitir que cada componente seja mensurado de maneira individualizada, deve-se realizar uma soroneutralização nas vacinas em análise. Para isso, são adicionados antissoros aos meios de cultura usados como diluentes. Os antissoros possuem altos títulos de anticorpos frente ao vírus homólogo e ausência ou baixa reação cruzada com o vírus heterólogo.

Cada tipo de antissoro foi diluído em meio DMEM | Sigma-Aldrich, concentração 1X, previamente filtrado com solução de bicarbonato de sódio 7,5% (p/v) para ajuste do pH, e suplementado da mesma maneira que o meio de cultura descrito no Item 4.3.2, com exceção do soro fetal bovino que, neste caso, não foi adicionado. Os antissoros foram preparados de forma a conseguirem neutralizar pelo menos 1.000 CCID<sub>50</sub> do vírus homólogo, como mostra a Tabela 5.



Tabela 5 – Denominação e componentes usados em cada antissoro preparado.

<b>Vírus a Titular</b>	<b>Denominação do Antissoro</b>	<b>Componente</b>
Poliovírus Tipo 1	Antissoro Tipo 3	Soro antipolio Tipo 3
Poliovírus Tipo 3	Antissoro Tipo 1	Soro antipolio Tipo 1

Fonte: (Do autor, 2017).

#### 4.3.4 Preparo do meio de diluição das vacinas

Para a diluição das vacinas, utilizou-se meio DMEM | Sigma-Aldrich, concentração 1X, previamente filtrado com solução de bicarbonato de sódio 7,5% (p/v) para ajuste do pH, e suplementado da mesma maneira que o meio de cultura descrito no Item 4.3.2, com exceção do soro fetal bovino que, neste caso, também não foi adicionado.

#### 4.3.5 Procedimentos para diluição e soroneutralização das vacinas

Antes do procedimento de diluição das amostras, as bisnagas dos lotes A e B, que estavam armazenadas à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , foram descongeladas à temperatura ambiente e homogeneizadas. Os ensaios foram realizados por dois analistas, a saber:

Analista 1 – realizou dois ensaios independentes, em que foi usada uma bisnaga do lote A por ensaio, testada em triplicata ( $n_1=6$ ), em paralelo ao uso do lote B, testado em duplicata.

Analista 2 – realizou ensaio único, em que foi usada uma bisnaga do lote A, testada em seis réplicas ( $n_2=6$ ), em paralelo ao uso do lote B, testado em duplicata.

Foram realizadas as mesmas diluições, tanto para o lote A quanto para o lote B, de acordo com a Tabela 6. As diluições foram feitas em tubos de vidro do tipo 13x100 mm, estéreis e devidamente identificados, utilizando o diluente descrito no Item 4.3.4.

Tabela 6 – Esquema de diluições para a determinação da potência da vacina bivalente.

<b>Diluição (log<sub>10</sub>)</b>	<b>Diluyente (mL)</b>	<b>Vacina (mL)</b>
-1,0	1,8	0,2 da vacina
-2,0	1,8	0,2 da diluição -1,0
-3,0	1,8	0,2 da diluição -2,0
-3,5	1,8	0,8 da diluição -3,0
-4,0	1,8	0,8 da diluição -3,5
-4,5	1,8	0,8 da diluição -4,0
-5,0	1,8	0,8 da diluição -4,5
-5,5	1,8	0,8 da diluição -5,0
-6,0	1,8	0,8 da diluição -5,5
-6,5	1,8	0,8 da diluição -6,0

Fonte: (Do autor, 2017); (Adaptado de INCQS, 2015a).

Em seguida, realizou-se a etapa de neutralização das vacinas em análise, onde 400 µL de cada diluição (de acordo com o tipo de vírus que se deseja titular) foram misturados com 400 µL de antissoro ou de diluyente, de acordo com o esquema a seguir:

Para a titulação de poliovírus tipo 1, as diluições de -4,5 a -6,5 (400 µL de cada) foram misturadas, em tubos de vidro (13x100 mm) estéreis e devidamente identificados, com igual volume da preparação de antissoro tipo 3.

Para a titulação de poliovírus tipo 3, as diluições de -4,0 a -6,0 (400 µL de cada) foram misturadas, em tubos de vidro (13x100 mm) estéreis e devidamente identificados, com igual volume da preparação de antissoro tipo 1.

Para a titulação do vírus total (bivalente), as diluições de -4,5 a -6,5 (400 µL de cada) foram misturadas, em tubos de vidro (13x100 mm) estéreis e devidamente identificados, com igual volume de diluyente (o mesmo usado na etapa de diluição das vacinas).

Os tubos de vidro contendo as misturas (vírus + antissoros e vírus + diluente) foram cobertos com papel alumínio e incubados em estufa a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 1 hora.

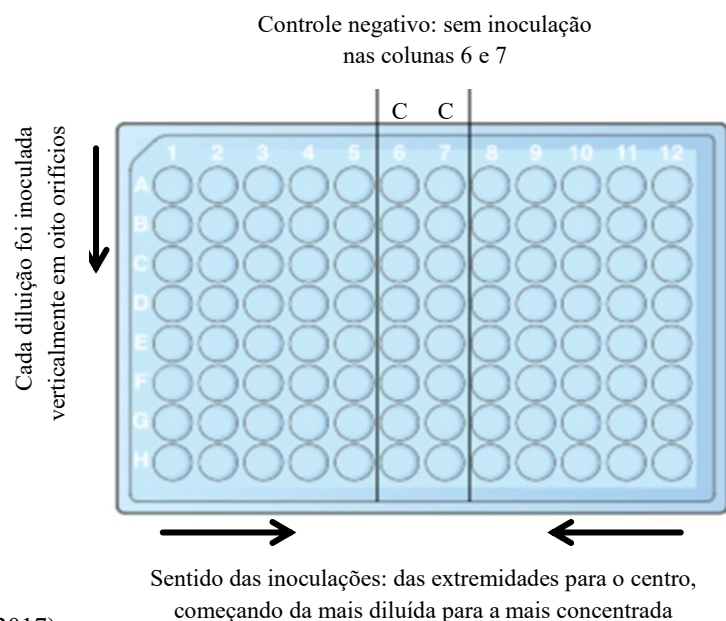
#### 4.3.6 Distribuição da suspensão celular nas microplacas

Durante o período de incubação para a neutralização das vacinas, a suspensão celular Hep-2C, fornecida na concentração final de  $2,0 \times 10^5 \pm 0,4$  células/mL, foi distribuída em microplacas de 96 orifícios de fundo plano, sendo 100  $\mu\text{L}$  da suspensão em cada orifício da microplaca.

#### 4.3.7 Inoculação das diluições na cultura de células

Após o período de soroneutralização, cada diluição do lote A e do lote B foi inoculada, verticalmente, em oito orifícios da microplaca já contendo a suspensão celular, sendo 50  $\mu\text{L}$ /orifício. A inoculação foi feita a partir das extremidades para o meio da placa, seguindo a ordem da mistura mais diluída para a mais concentrada. As colunas centrais (colunas 6 e 7) foram utilizadas como controle negativo (controle de células, CC) e, portanto, não houve inoculação das diluições nesses orifícios. A Figura 2 ilustra o esquema de inoculação para o ensaio de potência da vacina bivalente.

Figura 2 – Esquema representativo da inoculação vertical das diluições na microplaca.



Fonte: (Do autor, 2017).

Após a inoculação das diluições, cada microplaca foi coberta com tampa apropriada, agitada e incubada em estufa a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por sete dias.

#### 4.3.8 Leitura e avaliação estatística dos resultados

Após o período de incubação, as culturas de células inoculadas foram observadas em microscópio invertido quanto à presença ou ausência de efeito citopático em cada uma das diluições. Os títulos virais das vacinas foram calculados segundo o método estimativo de Spearman & Karber (FINNEY, 1964; KÄRBER, 1931; SPEARMAN, 1908), o qual leva em consideração a quantidade de orifícios positivos em cada diluição inoculada, e expressos em  $\text{CCID}_{50}$  por dose humana. Para tal, usou-se uma planilha de cálculos validada.

#### 4.4 Critérios de validação do ensaio

Para que os testes sejam considerados válidos, são avaliados os seguintes critérios:

- a) o CC deve apresentar monocamada bem definida e inalterada ao final do ensaio;
- b) o título da vacina de Referência de Trabalho atual, para cada tipo de vírus titulado, deve estar entre os limites inferiores e superiores do intervalo de confiança preestabelecido, conforme registrado no caderno de validação de material de referência do LVV/CC;
- c) o efeito citopático deve ser decrescente frente às diluições crescentes.

A vacina tem a sua potência aprovada quando o título calculado estiver de acordo com as especificações da Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, volume II (ANVISA, 2010), descritas na Tabela 4, no Item 4.2.

#### 4.5 Política de reteste

Em caso de resultados insatisfatórios, deve-se repetir o ensaio para os tipos de vírus em que a potência estiver fora das especificações, e o título final será a média geométrica dos dois testes realizados.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Ensaio de potência – Analista 1

Os resultados encontrados para cada uma das diluições mostradas nas tabelas abaixo correspondem ao número de orifícios positivos para o efeito citopático celular, que varia de zero (nenhum efeito observado) a oito (efeito observado em todos os orifícios).

As Tabelas 7, 8 e 9 mostram os resultados obtidos para as titulações dos sorotipos 1, 3 e do vírus total (bivalente) do lote A, respectivamente.

Tabela 7 – Analista 1 | Leitura dos resultados da titulação do sorotipo 1 do lote A: número de orifícios positivos para o efeito citopático.

Sorotipo 1						
Log <sub>10</sub> Dil.	Ensaio 1			Ensaio 2		
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 4	Replicata 5	Replicata 6
-4,5	8	8	8	8	8	8
-5,0	7	7	7	7	5	7
-5,5	2	2	3	1	4	5
-6,0	1	1	0	1	1	0
-6,5	0	1	1	1	1	0

Fonte: (Do autor, 2018).

Tabela 8 – Analista 1 | Leitura dos resultados da titulação do sorotipo 3 do lote A: número de orifícios positivos para o efeito citopático.

Sorotipo 3						
Log <sub>10</sub> Dil.	Ensaio 1			Ensaio 2		
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 4	Replicata 5	Replicata 6
-4,0	8	8	8	8	8	8
-4,5	8	8	8	8	8	8
-5,0	6	7	7	6	7	7
-5,5	3	5	4	3	5	3
-6,0	3	0	1	3	1	1

Fonte: (Do autor, 2018).

Tabela 9 – Analista 1 | Leitura dos resultados da titulação do vírus total (bivalente) do lote A: número de orifícios positivos para o efeito citopático.

<b>Vírus Total – Bivalente</b>						
<b>Log<sub>10</sub> Dil.</b>	<b>Ensaio 1</b>			<b>Ensaio 2</b>		
	<b>Replicata 1</b>	<b>Replicata 2</b>	<b>Replicata 3</b>	<b>Replicata 4</b>	<b>Replicata 5</b>	<b>Replicata 6</b>
-4,5	8	8	8	8	8	8
-5,0	6	7	6	7	6	8
-5,5	3	5	7	5	4	6
-6,0	1	3	1	0	4	1
-6,5	1	1	1	1	2	0

Fonte: (Do autor, 2018).

As Tabelas 10, 11 e 12 mostram os resultados obtidos para as titulações dos sorotipos 1, 3 e do vírus total (bivalente) do lote B, respectivamente.

Tabela 10 – Analista 1 | Leitura dos resultados da titulação do sorotipo 1 do lote B: número de orifícios positivos para o efeito citopático.

<b>Sorotipo 1</b>				
<b>Log<sub>10</sub> Dil.</b>	<b>Ensaio 1</b>		<b>Ensaio 2</b>	
	<b>Replicata 1</b>	<b>Replicata 2</b>	<b>Replicata 3</b>	<b>Replicata 4</b>
-4,5	8	8	8	8
-5,0	7	8	7	8
-5,5	3	5	2	4
-6,0	2	4	2	2
-6,5	0	1	0	2

Fonte: (Do autor, 2018).

Tabela 11 – Analista 1 | Leitura dos resultados da titulação do sorotipo 3 do lote B: número de orifícios positivos para o efeito citopático.

<b>Sorotipo 3</b>				
	<b>Ensaio 1</b>		<b>Ensaio 2</b>	
<b>Log<sub>10</sub> Dil.</b>	<b>Replicata 1</b>	<b>Replicata 2</b>	<b>Replicata 3</b>	<b>Replicata 4</b>
-4,0	8	8	8	8
-4,5	8	8	8	8
-5,0	8	8	4	7
-5,5	4	1	2	5
-6,0	1	2	3	1

Fonte: (Do autor, 2018).

Tabela 12 – Analista 1 | Leitura dos resultados da titulação do vírus total (bivalente) do lote B: número de orifícios positivos para o efeito citopático.

<b>Vírus Total – Bivalente</b>				
	<b>Ensaio 1</b>		<b>Ensaio 2</b>	
<b>Log<sub>10</sub> Dil.</b>	<b>Replicata 1</b>	<b>Replicata 2</b>	<b>Replicata 3</b>	<b>Replicata 4</b>
-4,5	8	8	8	8
-5,0	8	8	8	7
-5,5	7	3	3	5
-6,0	0	3	4	2
-6,5	0	0	2	1

Fonte: (Do autor, 2018).

Pelas leituras obtidas, pode-se observar que o efeito citopático foi decrescente frente às diluições crescentes para todos os tipos de vírus titulados, tanto para o lote A quanto para o lote B. Além disso, todas as monocamadas celulares do controle negativo mantiveram-se bem definidas e inalteradas após o período de incubação das microplacas (dados não mostrados).

### 5.1.1 Cálculo das potências das vacinas

Tomando por base os resultados mostrados nas tabelas do Item 5.1, os títulos de cada sorotipo presente na formulação e do vírus total (bivalente) foram calculados, tanto para o lote A quanto para o lote B. Para isso, usou-se o método estimativo de Spearman & Karber (FINNEY, 1964; KÄRBER, 1931; SPEARMAN, 1908), através de uma planilha de cálculos validada.

As Tabelas 13 e 14 mostram os valores de potência (em  $\log_{10}$ ) calculados para cada replicata, bem como as médias (em  $\log_{10}$ ) e os desvios-padrões de cada sorotipo titulado, para o lote A e para o lote B, respectivamente.

Tabela 13 – Analista 1 | Valores de potência (em  $\log_{10}$ ), médias (em  $\log_{10}$ ) e desvios-padrões calculados para cada sorotipo presente no lote A.

	<b>Valores de Potência (<math>\log_{10}</math>)</b>		
	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>Bivalente</b>
<b>Replicata 1</b>	5,98	6,10	6,04
<b>Replicata 2</b>	6,04	6,10	6,35
<b>Replicata 3</b>	6,04	6,10	6,29
<b>Replicata 4</b>	5,98	6,10	6,16
<b>Replicata 5</b>	6,04	6,16	6,35
<b>Replicata 6</b>	6,10	6,04	6,29
<b>Média</b>	<b>6,03</b>	<b>6,10</b>	<b>6,25</b>
<b>DP</b>	<b>0,045</b>	<b>0,038</b>	<b>0,123</b>

Legenda: DP = desvio padrão

Fonte: (Do autor, 2018).



Tabela 14 – Analista 1 | Valores de potência (em  $\log_{10}$ ), médias (em  $\log_{10}$ ) e desvios-padrões calculados para cada sorotipo presente no lote B.

	<b>Valores de Potência (<math>\log_{10}</math>)</b>		
	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>Bivalente</b>
<b>Replicata 1</b>	6,10	6,16	6,29
<b>Replicata 2</b>	6,48	6,04	6,23
<b>Replicata 3</b>	6,04	5,91	6,41
<b>Replicata 4</b>	6,35	6,16	6,29
<b>Média</b>	<b>6,24</b>	<b>6,07</b>	<b>6,31</b>
<b>DP</b>	<b>0,208</b>	<b>0,119</b>	<b>0,075</b>

Legenda: DP = desvio padrão

Fonte: (Do autor, 2018).

## 5.2 Ensaio de potência – Analista 2

Os resultados encontrados para cada uma das diluições mostradas nas tabelas abaixo correspondem ao número de orifícios positivos para o efeito citopático celular, que varia de zero (nenhum efeito observado) a oito (efeito observado em todos os orifícios).

As Tabelas 15, 16 e 17 mostram os resultados obtidos para as titulações dos sorotipos 1, 3 e do vírus total (bivalente) do lote A, respectivamente.

Tabela 15 – Analista 2 | Leitura dos resultados da titulação do sorotipo 1 do lote A: número de orifícios positivos para o efeito citopático.

<b>Sorotipo 1</b>						
<b>Ensaio 1</b>						
<b>Log<sub>10</sub> Dil.</b>	<b>Replicata 1</b>	<b>Replicata 2</b>	<b>Replicata 3</b>	<b>Replicata 4</b>	<b>Replicata 5</b>	<b>Replicata 6</b>
-4,5	2	2	3	2	3	4
-5,0	1	1	1	1	1	0
-5,5	1	0	0	0	0	0
-6,0	0	0	0	0	0	0
-6,5	0	0	0	0	0	0

Fonte: (Do autor, 2018).

Tabela 16 – Analista 2 | Leitura dos resultados da titulação do sorotipo 3 do lote A: número de orifícios positivos para o efeito citopático.

<b>Sorotipo 3</b>						
<b>Ensaio 1</b>						
<b>Log<sub>10</sub> Dil.</b>	<b>Replicata 1</b>	<b>Replicata 2</b>	<b>Replicata 3</b>	<b>Replicata 4</b>	<b>Replicata 5</b>	<b>Replicata 6</b>
-4,0	8	8	8	8	6	7
-4,5	5	5	7	3	5	4
-5,0	3	4	2	2	2	1
-5,5	0	2	2	0	1	0
-6,0	0	0	0	0	0	1

Fonte: (Do autor, 2018).

Tabela 17 – Analista 2 | Leitura dos resultados da titulação do vírus total (bivalente) do lote A: número de orifícios positivos para o efeito citopático.

<b>Vírus Total – Vírus Bivalente</b>						
<b>Ensaio 1</b>						
<b>Log<sub>10</sub> Dil.</b>	<b>Replicata 1</b>	<b>Replicata 2</b>	<b>Replicata 3</b>	<b>Replicata 4</b>	<b>Replicata 5</b>	<b>Replicata 6</b>
-4,5	8	5	8	7	6	5
-5,0	4	3	6	5	4	3
-5,5	3	0	2	4	1	0
-6,0	1	0	0	0	0	1
-6,5	2	0	0	0	0	0

Fonte: (Do autor, 2018).

As leituras das titulações do sorotipo 3 e do vírus total (bivalente) do lote A mostram efeito citopático decrescente frente às diluições crescentes, enquanto que, para o sorotipo 1, a leitura não pôde ser realizada de maneira adequada. Para o lote B, as leituras não foram realizadas devido à inviabilidade das células na maioria dos orifícios (dados não mostrados).

Além disso, em quase todas as microplacas, o controle negativo de células encontrava-se alterado, uma vez que muitas células apresentavam morfologia inadequada e não havia confluência da monocamada celular.

### 5.2.1 Cálculo das potências das vacinas

Devido à inviabilidade do ensaio de potência feito pelo segundo analista, os títulos das vacinas analisadas não puderam ser calculados.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo descreve o processo para a eleição de um novo lote de vacina de Referência de Trabalho utilizado nos ensaios de potência da VOPb. Por definição, vacinas para uso humano são medicamentos de caráter profilático, capazes de induzir imunidade específica no indivíduo vacinado frente a um agente infeccioso, podendo ser constituídas por microrganismos inativados, microrganismos atenuados, substâncias por eles produzidas ou frações antigênicas (ANVISA, 2010).

No INCQS, a vacina oral bivalente contra a poliomielite é submetida a três tipos de ensaios laboratoriais: ensaio de esterilidade, ensaio de potência e ensaio de termoestabilidade (INCQS, 2018). Por definição, a potência avalia a eficácia da vacina, ou seja, sua capacidade de indução de imunidade protetora após a administração. A eficácia da VOPb depende da concentração relativa dos dois sorotipos que compõem o produto final (sorotipos 1 e 3), sendo estimada através de um ensaio *in vitro* (ELISBERG, 1984).

Para a realização dos ensaios de potência, a OMS preconiza o uso de um material de referência adequado, que pode consistir numa vacina de Referência de Trabalho validada frente a uma vacina de Referência Internacional de título conhecido. Este deve ser testado em paralelo com as amostras, sempre que o ensaio for realizado (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1997).

A metodologia do ensaio de potência para a avaliação da atividade biológica da vacina bivalente é a mesma metodologia preconizada para a vacina trivalente, em que a titulação e a soroneutralização dos sorotipos virais (1 e 3 ou 1, 2 e 3) são realizadas através do uso de culturas de células da linhagem Hep-2C, em um ensaio *in vitro*. As células utilizadas para a infecção, titulação, neutralização com antissoro e obtenção da potência são células com susceptibilidades específicas para os antígenos virais dos sorotipos 1, 2 e 3 do poliovírus. Uma das características que evidencia a presença do vírus nas culturas é a formação do efeito citopático, isto é, presença de alterações morfológicas nas células. Os efeitos citopáticos observados após a titulação dos sorotipos virais, apresentados nos ensaios realizados pelo Analista 1, foram decrescentes frente às diluições crescentes para todos os sorotipos titulados, tanto para o lote candidato (lote A) quanto para a vacina de Referência de Trabalho em uso no laboratório (lote B). Tais resultados são condizentes com o resultado esperado descrito na metodologia preconizada para o ensaio, que relata a presença de um número maior de orifícios positivos nas menores diluições (mais concentradas).

Além disso, os resultados dos ensaios realizados pelo Analista 1 evidenciam que o lote candidato apresenta títulos satisfatórios para cada sorotipo presente na formulação, uma vez que os valores de potência calculados (Tabela 13) estão de acordo com as especificações para a VOPb descritas na norma oficial (Tabela 4). Os valores de potência calculados para todos os sorotipos da vacina de Referência de trabalho em uso (Tabela 14) estão dentro dos limites inferiores e superiores do intervalo de confiança estabelecido na validação deste lote (Tabela 3), o que atesta a validade dos ensaios feitos pelo Analista 1 e dos resultados obtidos.

Os ensaios para a avaliação da potência da VOPb envolvem uma complexa reação biológica entre vírus, células, antissoros e meios de cultura (WOOD; MACADAM, 1997). Deste modo, quaisquer variações nestes aspectos podem afetar de maneira significativa o desempenho dos ensaios e a confiabilidade dos dados obtidos. Fatores como a infectividade dos vírus, a susceptibilidade e estabilidade das culturas de células, as condições de cultivo celular e a neutralização das vacinas em teste devem ser bem controlados, de modo a não interferirem na obtenção dos resultados.

No ensaio realizado pelo Analista 2, pode-se observar que as alterações nas culturas celulares foram determinantes para a reprovação do teste. Mesmo que tenha sido possível efetuar as leituras do sorotipo 3 (Tabela 16) e do vírus total (Tabela 17) do lote A, e que estas tenham apresentado efeito citopático decrescente frente às diluições crescentes, a falta dos dados do controle negativo de células e do lote B inviabiliza a aprovação do ensaio. Em caso de resultados insatisfatórios ou de ensaio inválido, deve-se realizar novo teste de potência, como descrito no Item 4.5. Entretanto, o planejamento para a realização de um novo ensaio envolve uma dinâmica de eventos, que vão desde a solicitação de células, harmonização dos reagentes, frascos de vidros, micropipetas calibradas até o uso de estufa qualificada, os quais demandam tempo.

É conhecido que o trabalho realizado com sistemas envolvendo culturas de células requer uma atenção cuidadosa às condições de cultivo e aos procedimentos de manutenção das mesmas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004). A padronização dos sistemas *in vitro* começa com o controle dos materiais de partida, que envolvem as células, os meios de cultura e os reagentes utilizados. Para garantir a qualidade e a rastreabilidade dos resultados, recomenda-se que as culturas sejam adquiridas de fontes confiáveis, autenticadas, como é o caso dos repositórios nacionais ou internacionais de culturas celulares (HARTUNG *et al.*, 2002). As linhagens contínuas Hep-2C, assim como os meios de cultura e os reagentes usados nos ensaios de potência, foram obtidos de produtores conhecidos pela alta qualidade de seus produtos.

Existem duas características fundamentais para a garantia da qualidade dos ensaios que usam culturas celulares:

**Pureza** – a contaminação por microrganismos, como fungos e bactérias, geralmente mata as células em cultura. A contaminação por micoplasma, por sua vez, não provoca morte celular, mas pode alterar o comportamento das células (por exemplo, a capacidade de manter monocamadas). Assim, é imprescindível que as técnicas sejam executadas de acordo com as boas práticas de laboratório, e que a contaminação celular seja evitada (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004).

**Estabilidade** – alterações na estabilidade das culturas celulares também influenciam os resultados dos ensaios. Células submetidas a passagens em série por longos períodos de tempo mostram, invariavelmente, sinais de alteração em suas características genotípicas ou fenotípicas. Tais variações podem causar degeneração celular, afetando a sensibilidade das mesmas à infecção pelo poliovírus (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004).

Neste contexto, existe a necessidade de se fazer uma investigação criteriosa acerca dos aspectos que levaram à não aprovação dos resultados obtidos pelo Analista 2. Para tanto, estamos realizando uma avaliação através do *check list* de todos os parâmetros utilizados no ensaio, antes de darmos continuidade às análises de potência para a eleição do novo lote de Referência de Trabalho para a vacina VOPb.

## 7 CONCLUSÃO

A análise dos resultados obtidos no presente estudo permite concluir que:

- De acordo com os ensaios realizados pelo Analista 1, o lote A apresentou valores de potência em conformidade com as especificações exigidas pela Farmacopeia Brasileira. Além disso, o lote B também apresentou valores de potência satisfatórios em relação aos dados obtidos na validação do mesmo, o que atesta a validade dos ensaios feitos.
- O ensaio realizado pelo Analista 2 não pôde ser considerado válido, devido às alterações observadas nas monocamadas celulares (controle negativo e orifícios inoculados com as diluições das vacinas), tanto para o lote A quanto para o lote B.
- Os dados mostrados no presente trabalho constituem um estudo que visa à eleição de um novo lote de vacina de Referência de Trabalho para a VOPb. Após avaliação criteriosa, o LVV/CC retomará, o mais breve possível, os ensaios para as análises de potência deste lote.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, D. S. **Estabelecimento de material de referência para a determinação da potência da vacina sarampo, caxumba e rubéola (atenuada) pelo fabricante nacional (Bio-Manguinhos)**. 2014. 116 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.
- BANDYOPADHYAY, A. S. et al. Polio vaccination: past, present and future. **Future Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 791–808, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**, Brasília, 2010. 442 p.
- \_\_\_\_\_. **Guia de Vigilância em Saúde**, Brasília, 2016. 773 p.
- \_\_\_\_\_. **Plano de erradicação da poliomielite: estratégia no Brasil**. Brasília, 2015. 70 p.
- CAMPOS, A. L. V. de; NASCIMENTO, D. R. do; MARANHÃO, E. A história da poliomielite no Brasil e seu controle por imunização. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, v. 10, n. 2, p. 573–600, 2003.
- CARVALHO, R. F. **Avaliação da potência do componente da hepatite B nas vacinas combinadas pentavalente (DTP/HB/Hib) de diferentes produtores**. 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.
- CARVALHO, L. H. F.; WECKX, L. Y. Universal use of inactivated polio vaccine. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 3, p. 75–82, 2006.
- CIAPPONI, A. et al. Sequential inactivated (IPV) and live oral (OPV) poliovirus vaccines for preventing poliomyelitis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 8, 2014.
- DE JESUS, N. H. Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis. **Virology Journal**, v. 4, n. 70, 2007.
- DOMINGUES, C. M. A. S.; TEIXEIRA, A. M. S. Coberturas vacinais e doenças imunopreveníveis no Brasil no período 1982-2012: avanços e desafios do Programa Nacional de Imunizações. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 22, n. 1, p. 9–27, jan-mar 2013.



DURANTE, A. L. T. C.; POZ, M. R. D. Saúde global e responsabilidade sanitária brasileira: o caso da erradicação da poliomielite. **Saúde Debate**, v. 38, n. 100, p. 129–138, jan-mar 2014.

ELISBERG, B. L. Standardization of safety and potency tests of vaccines against poliomyelitis. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 6, n. 2, p. 519–522, mai-jun 1984.

EVANS, A. F.; KASLOW, R. A. **Viral infections of humans: epidemiology and control**. 4. ed. New York: Springer Science+Business Media New York, 1997.

FARMACOPEIA Brasileira. 5 ed. Brasília: ANVISA, 2010. 2 v.

FINNEY, D. J. **Statistical method in biological assay**. 2. ed. London: Griffin, 1964.

GARON, J. R.; COCHI, S. L.; ORENSTEIN, W. A. The challenge of global poliomyelitis eradication. **Infect. Dis. Clin. N. Am.**, v. 29, n. 4, p. 651–665, 2015.

HAMPTON, L. M. et al. Cessation of trivalent oral poliovirus vaccine and introduction of inactivated poliovirus vaccine - Worldwide, 2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 35, p. 934–938, set 2016.

HARTUNG, T. et al. Good Cell Culture Practice. **ATLA**, v. 30, p. 407–414, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). Informações do Site. Disponível em:

<[https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=87&Itemid=95](https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=87&Itemid=95)> Acesso em: 05 jan. 2018.

\_\_\_\_\_. **POP 65.3430.002**: ensaios de potência e de termoestabilidade da vacina oral contra a poliomielite. Rev. 6. Rio de Janeiro, 2015a. 12 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

\_\_\_\_\_. **POP 65.3430.008**: preparo de meios de cultura e soluções utilizados em cultivos celulares. Rev. 9. Rio de Janeiro, 2015b. 10 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

\_\_\_\_\_. **POP 65.3430.031**: manutenção de cultivos celulares aderentes. Rev. 5. Rio de Janeiro, 2016. 11 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

KÄRBER, G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. **Exp Pathologie und Pharmakologie**, v. 162, n. 4, p. 480–483, 1931.

KASVI. A importância da qualidade para o cultivo celular. Disponível em: <<http://www.kasvi.com.br/qualidade-cultivo-celular/>> Acesso em: 16 jan. 2018.

MCVEY, D. S.; GALVIN, J. E.; OLSON, S. C. A review of the effectiveness of vaccine potency control testing. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 507–516, 2003.

METZ, B. et al. Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. **Vaccine**, v. 20, p. 2411–2430, 2002.

MIGITA, N. A. **Cultivo celular *in vitro***: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares. 2012. 68 f. Monografia (Graduação em Ciências Biomédicas). Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Calendário Nacional de Vacinação - Ano 2018. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/acoes-e-programas/vacinacao/calendario-nacional-de-vacinacao>> Acesso em: 24 jan. 2018.

NASCIMENTO, D. R. (Org.) **Projeto a história da poliomielite e de sua erradicação no Brasil: Seminários**. Rio de Janeiro: Casa de Oswaldo Cruz, 2004.

NETTO, E. J. R. **Avaliação do controle da qualidade das vacinas contra febre amarela analisadas no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde no período de 2000 a 2008**. 2010. 66 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Manual of laboratory methods for potency testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunization**. Genebra, 1997.

\_\_\_\_\_. **Polio laboratory manual**. Genebra, 2004.

\_\_\_\_\_. Casos de poliomielite causados por poliovírus selvagem, de 2013 a 2017, divididos pelas seis regiões da OMS. Disponível em: <<https://extranet.who.int/polis/public/CaseCount.aspx>> Última atualização e acesso em: 27 dez. 2017.

\_\_\_\_\_. Weekly epidemiological record - Polio vaccines and polio immunization in the pre-eradication era: WHO position paper. **Weekly Epidemiological Record**, v. 85, n. 23, p. 213–228, 2010.

\_\_\_\_\_. Weekly epidemiological record - Polio vaccines: WHO position paper. **Weekly Epide2**, v. 91, n. 12, p. 145–168, 2016.

PATEL, M. et al. Polio endgame: the global introduction of inactivated polio vaccine. **Expert Rev. Vaccines**, v. 14, n. 5, p. 749–762, 2015.

PATEL, M.; ORENSTEIN, W. A world free of polio - The final steps. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 6, p. 501–503, fev 2016.

SANTOS, J. E. **Avaliação retrospectiva do ensaio de potência da vacina oral contra a poliomielite utilizada no Brasil no período de 2008 a 2009**. 2010. 89 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

SANTOS, J. E. et al. Aplicação do conceito do erro total na validação do ensaio de potência da vacina oral contra a poliomielite. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 70, n. 4, p. 613–621, 2011.

SILVA JÚNIOR, J. B. 40 anos do Programa Nacional de Imunizações: uma conquista da Saúde Pública Brasileira. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 22, n. 1, p. 7–8, jan-mar 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNIZAÇÕES. Informações do Site. Disponível em: <<https://familia.sbim.org.br/vacinas/vacinas-disponiveis?start=20>> Acesso em: 24 jan. 2018.

SPEARMAN, C. The method of “right and wrong cases” (“constant stimuli”) without Gauss’s Formula. **British Journal of Psychology**, v. 2, n. 3, p. 227–242, jan. 1908.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 940 p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia Básica**. 4. ed. Ed. Atheneu, 2005. 718 p.

VIRALZONE. Estrutura esquemática do poliovírus. Disponível em: <[http://viralzone.expasy.org/97?outline=all\\_by\\_species](http://viralzone.expasy.org/97?outline=all_by_species)> Acesso em: 19 ago. 2017.

WOOD, D. J.; MACADAM, A. J. Laboratory tests for live attenuated poliovirus vaccines. **Biologicals**, v. 25, p. 3–15, 1997.

# ANEXO A – CALENDÁRIO NACIONAL DE VACINAÇÃO / ANO 2018

## Calendário Nacional de Vacinação 2018

Grupo A/B/C	Idade	BCG	Hepatite B	Penta/DTP	VIP/VOP	Pneumocócia 10V (conjugada)*	Rotavírus Humano	Meningocócia C (conjugada)†	Febre Amarela **	Hepatite A††††	Triplice Viral	Tetra viral†††††	Varicela††††	HPV†††††	Dupla Adulto	dTp††††††
Crianças	Ao nascer	Dose ao nascer														
	2 meses			1ª dose	1ª dose (com VIP)	1ª dose	1ª dose									
	3 meses							1ª dose								
	4 meses			2ª dose	2ª dose (com VIP)	2ª dose	2ª dose									
	5 meses							2ª dose								
	6 meses			3ª dose	3ª dose (com VIP)											
	9 meses								***Dose única							
	12 meses						Reforço	Reforço			1ª dose					
	15 meses			1º reforço (com DTP)	1º reforço (com VOP)					Uma dose		Uma dose				
	4 anos				2º reforço (com DTP)	2º reforço (com VOP)										
	9 anos															
	Adolescente	10 a 19 anos	3 doses (verificar a situação vacinal)					01 reforço ou dose única (verificar a situação vacinal - 11 a 14 anos)		Dose única (não vacinado ou sem comprovante de vacinação)		2 doses (verificar a situação vacinal)			2 doses (meninos de 9 a 14 anos) 2 doses (meninas de 11 a 14 anos)	Reforço a cada (10 anos)
20 a 29 anos		3 doses (verificar a situação vacinal)							Dose única (não vacinado ou sem comprovante de vacinação)		2 doses (20 a 29 anos) 1 dose (30 a 49 anos)				Reforço a cada (10 anos)	
Idoso	60 anos ou mais	3 doses (verificar a situação vacinal)							Dose única (não vacinado ou sem comprovante de vacinação)						Reforço a cada (10 anos)	
		3 doses (verificar a situação vacinal)													3 doses (verificar a situação vacinal)	Uma dose a cada geração a partir da 20ª semana
Gestante																

**Nota:** \*A administrar Uma dose da vacina Pneumocócia 10V (conjugada) e da vacina Meningocócia C (conjugada) em crianças entre 2 e 4 anos, que não tenham recebido o reforço ou que tenham perdido a oportunidade de se vacinar anteriormente.

\*\* Indica as pessoas residentes ou viajantes para as áreas com recomendação de vacina. Alertar as precauções e contra-indicações para vacinação.

\*\*\*Indicada para os residentes dos municípios das áreas amparadas para vacinação que anteriormente eram áreas SEM recomendação para vacinação dos estados de SP, RJ, PR, SC, ES, BA e PI.

\*\*\*\*Administrar uma dose da vacina Hepatite A, em crianças entre 2 e 4 anos, que tenham perdido a oportunidade de se vacinar anteriormente.

\*\*\*\*\*A vacina tetra viral corresponde à segunda dose da vacina varicela. Esta vacina está disponível para crianças até 4 anos 11 meses e 29 dias oportunamente vacinadas aos 15 meses.

\*\*\*\*\*Corresponde à segunda dose da vacina varicela. Esta vacina está disponível para crianças até 6 anos 11 meses e 29 dias.

\*\*\*\*\*A vacina HPV também está disponível para as mulheres e homens de nove a 26 anos de idade vivendo com HIV/AIDS, transplantados de órgãos sólidos, de medula óssea ou pacientes oncológicos, sendo o esquema vacinal de três doses (0, 2 e 6 meses).

\*\*\*\*\*Gestantes que perderam a oportunidade de serem vacinadas durante o período gestacional, administrar Uma dose de dTp no puerpério, o mais precoce entre possível. A vacina dTp também será ofertada para profissionais de saúde que atuam em maternidade e em unidade de internação neonatal (UTI/UCI convencional e UCI câmara) atendendo recém-nascidos e crianças menores de 1 ano de idade.