

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

Inah Francisco de Paula do Arte

**ELABORAÇÃO DE CARTA CONTROLE DA VACINA DE REFERÊNCIA PARA
UTILIZAÇÃO NOS ENSAIOS DE POTÊNCIA DA VACINA DA DENGUE**

Rio de Janeiro

2019

Inah Francisco de Paula do Arte

ELABORAÇÃO DE CARTA CONTROLE DA VACINA DE REFERÊNCIA PARA
UTILIZAÇÃO NOS ENSAIOS DE POTÊNCIA DA VACINA DA DENGUE

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 por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Tutora: Renata Faria de Carvalho

Preceptora: Simone Ferreira Teixeira Bastos

Rio de Janeiro

2019

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Do Arte, Inah Francisco de Paula

Elaboração de carta controle da vacina de referência para utilização nos ensaios de potência da vacina da dengue. / Inah Francisco de Paula do Arte. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019.

57 f. : il.; 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: Renata Faria de Carvalho.

Preceptoras: Simone Ferreira Teixeira Bastos.

1. Dengue. 2. Vacinas contra Dengue. 3. Gráfico de Controle. 4. Ensaio de potência. I. Título.

Elaboration of a reference vaccine control letter for use in dengue vaccine potency tests.

Inah Francisco de Paula do Arte

ELABORAÇÃO DE CARTA CONTROLE DA VACINA DE REFERÊNCIA PARA
UTILIZAÇÃO NOS ENSAIOS DE POTÊNCIA DA VACINA DA DENGUE

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 por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Marcelo Luiz de Lima Brandão (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Lúcia Maria Correa Werneck (Doutora)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Renata Faria de Carvalho (Mestre) – Tutora

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Simone Ferreira Teixeira Bastos (Mestre) – Preceptora

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

DEDICO...
AOS MEUS PAIS,
ISIS DE PAULA & LUIZ CARLOS DO ARTE.

AGRADECIMENTOS

Dedico especialmente à minha mãe pelo apoio e compreensão, aos ensinamentos e por me mostrar diferentes perspectivas sobre o que é viver e principalmente por acreditar no meu potencial.

À minha tutora, Renata Faria de Carvalho, por toda dedicação e empenho, pela orientação e carinho. Obrigada por compartilhar todo o seu conhecimento na área e por fazer parte não somente do meu crescimento profissional, mas também pessoal.

À minha preceptora, Simone Bastos, pelos ensinamentos passados, pela compreensão, pela ajuda e, principalmente, pelo incentivo em todos os momentos.

Ao Marcelo Brandão, por toda ajuda prestada nos ensaios e apoio para que este trabalho fosse realizado.

À Dra. Cátia Inês, que mesmo distante, sempre demonstrou carinho e afeto e, que mesmo em pouco tempo, me ensinou de forma ímpar e dedicada.

Aos colegas do Setor de Cultura de Células, Rubens Júnior e Sophia pelo convívio, pela amizade e pela paciência em me ensinar.

Aos amigos da turma da Residência, por todos os momentos divertidos compartilhados, alegria e companheirismo, em especial a Thaís Su, pela parceria no dia-a-dia do laboratório, pelo apoio, pelas conversas de incentivo e carinho, e ajuda nos ensaios.

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!

*A verdadeira coragem é ir atrás de seu
sonho mesmo quando todos dizem que ele é impossível.*

Lora Coralina

RESUMO

A dengue é uma doença febril, aguda de etiologia viral causada por qualquer um dos quatro sorotipos virais (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4), que podem ocasionar infecção assintomática, febre branda, febre hemorrágica da dengue ou síndrome de choque por dengue. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 2,2 milhões de casos no mundo foram notificados em 2010 e 3,2 milhões de casos em 2015. Hoje, a dengue é a mais importante arbovirose (doença transmitida por artrópodes) que afeta o homem e constitui-se em sérios problemas de saúde pública no mundo, especialmente em países tropicais, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do *Aedes aegypti*, principal vetor. A principal estratégia atualmente para se obter uma medida profilática eficaz na prevenção da doença é o desenvolvimento de uma vacina tetravalente contra dengue. Nesse contexto, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz) é o órgão responsável pelo controle de qualidade das vacinas utilizadas no Programa Nacional de Imunizações, realizando através de ensaios biológicos, a avaliação da potência e da termoestabilidade de vacinas. Um dos parâmetros para a garantia de qualidade para liberação de lotes é a análise de carta controle das vacinas de referência. Estas cartas (ou gráficos) controle são ferramentas utilizadas para monitorar e acompanhar o desempenho de um processo de medição, verificando por meio desses gráficos, se o processo está dentro dos limites permissíveis. O objetivo do presente estudo é elaborar uma carta controle da vacina de referência para utilização nos ensaios de potência da vacina da dengue. O ensaio baseou-se em um teste *in vitro* através da avaliação do efeito citopático celular, quantificando a infectividade do vírus da dengue por imunocolorimetria mediante aos quatro sorotipos em culturas de células de rim de macaco (VERO). Os mesmos foram realizados por dois analistas diferentes e mostraram resultados de potência satisfatórios para ambos, não observando desvios estatisticamente significativos. A construção dos gráficos foi elaborada mediante ao número de resultados de ensaios realizados (16 para os sorotipos 1, 3, e 4; quatro para o sorotipo 2), que mesmo embora não tenha alcançado os 20 resultados pré-estabelecidos para a fixação dos limites de controle, isso não inviabilizou os ensaios realizados no INCQS, já que novos ensaios serão realizados e incluídos para a construção do gráfico e fixação dos valores dos limites de controle.

Palavras-chave: Dengue. Vacina. Carta Controle. Ensaio de Potência.

ABSTRACT

Dengue is a febrile, acute viral disease caused by any of the four viral serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) that can cause asymptomatic infection, mild fever, dengue hemorrhagic fever or dengue shock syndrome. According to the World Health Organization (WHO), 2.2 million cases worldwide were reported in 2010 and 3.2 million cases in 2015. Nowadays, dengue is the most important arbovirose (arthropod-borne disease) that affects man and constitutes serious public health problems in the world, especially in tropical countries, where environmental conditions favor the development and proliferation of *Aedes aegypti*, the main vector. The main strategy currently in place to obtain an effective prophylactic measure in disease prevention is the development of a tetravalent vaccine against dengue. In this context, the National Institute of Quality Control in Health of the Oswaldo Cruz Foundation (INCQS / Fiocruz) is the main responsible for quality control of the vaccines used in the National Immunization Program, conducting biological tests to evaluate the potency and thermostability of vaccines. One of the parameters for quality assurance for batch release is the control chart analysis of the reference vaccines. These charts (or graphics) are tools used to monitor and keeping up with the performance of a measurement process, verifying through these charts whether the process is within permissible limits. The aim of the present study is to develop a control chart of the reference vaccine for use in the dengue vaccine potency trials. The assay was based on an *in vitro* test by assessing cell cytopathic effect, quantifying the infectivity of dengue virus by immunocolorimetry using the four serotypes in monkey kidney cell cultures (VERO). They were performed by two different analysts and showed satisfactory potency results for both, not observing statistically significant deviations. The construction of the graphs was done by means of the number of test results (16 for serotypes 1, 3 and 4, four for serotype 2), which even though it did not reach the 20 pre-established results for setting the limits of control, this did not invalidate the tests performed in the INCQS, since new tests will be performed and included for the construction of the chart and setting of the values of the control limits.

Keywords: Dengue. Vaccine. Control Chart. Vaccine Potency.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Linha do tempo dos aspectos históricos e epidemiológicos de registros e evolução da Dengue pelo mundo.	14
Figura 2 – Mapa da Organização Mundial da Saúde que apresenta as áreas vulneráveis a dengue em todo o planeta.	15
Figura 3 – Número médio de casos de dengue e dengue grave registrados anualmente à OMS em 1995-2007 e o número de casos relatados nos últimos anos, 2008-2010.	16
Figura 4 – Estrutura do vírus da Dengue.	17
Figura 5 – Ciclo epidemiológico da Dengue.	18
Figura 6 – Classificação dos casos de dengue pela gravidade.	19
Figura 7 – Preparação da megaplaca de diluição para o ensaio de potência da vacina da dengue.	33
Figura 8 – Esquema de inoculação vertical das diluições da vacina na microplaca.	34
Figura 9 – Comparação entre células não infectadas com células infectadas pelo vírus da dengue por microscopia óptica com aumento de 40x.	40
Figura 10 – Gráfico controle dos ensaios do sorotipo 1.	42
Figura 11 – Gráfico controle dos ensaios do sorotipo 2.	43
Figura 12 – Gráfico controle dos ensaios do sorotipo 3.	43
Figura 13 – Gráfico controle dos ensaios do sorotipo 4.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vacinas em desenvolvimento e registradas.	22
Tabela 2 – Leitura de poços infectados por placa em diferentes diluições (sorotipo 1) – Analista 1.	38
Tabela 3 – Leitura de poços infectados por placa em diferentes diluições (sorotipo 1) – Analista 2.	38
Tabela 4 – Leitura de poços infectados por placa em diferentes diluições (sorotipo 2) – Analista 1.	38
Tabela 5 – Leitura de poços infectados por placa em diferentes diluições (sorotipo 2) – Analista 2.	39
Tabela 6 – Leitura de poços infectados por placa em diferentes diluições (sorotipo 3) – Analista 1.	39
Tabela 7 – Leitura de poços infectados por placa em diferentes diluições (sorotipo 3) – Analista 2.	39
Tabela 8 – Leitura de poços infectados por placa em diferentes diluições (sorotipo 4) – Analista 1.	39
Tabela 9 – Leitura de poços infectados por placa em diferentes diluições (sorotipo 4) – Analista 2.	40
Tabela 10 – Cálculo final no <i>CombiStats</i> por analista – sorotipo 1.	41
Tabela 11 – Cálculo final no <i>CombiStats</i> por analista – sorotipo 2.	41
Tabela 12 – Cálculo final no <i>CombiStats</i> por analista – sorotipo 3.	41
Tabela 13 – Cálculo final no <i>CombiStats</i> por analista – sorotipo 4.	42
Tabela 14 – Limites estabelecidos pelo SPC Explorer RT.	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC – *American Tissue Culture Collection*
- BCG – *Bacilo Calmette-Guerin*
- BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro
- BTI – *Bacillus thuringiensis israelensi*
- Ca⁺² – Cálcio
- CC – Cultura de células
- CO₂ – Dióxido de Carbono
- COMBISTATS® V5.0 – *Software* estatístico
- CYD-TDV – Vacina tetravalente da dengue quimérica viva atenuada
- DENV – Vírus da dengue
- DH/SCD – Dengue Hemorrágico e Síndrome de Choque do Dengue
- DI – Departamento de Imunologia
- DICC₅₀ – Dose infectante de 50% da cultura celular
- DNA – Ácido Desoxirribonucléico
- DP – Desvio Padrão
- DTP – Vacina adsorvida contra difteria, tétano, pertussis
- ECACC – *The European Collection of Authenticated Cell Cultures*
- EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid*
- FEBRASGO – Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
- GSK – GlaxoSmithKline
- HEPES – *hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid* (Agente tamponante)
- IgG – Imunoglobulina G
- IgM – Imunoglobulina M
- INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
- LM – Lotes de células-mestre
- LT – Lotes de células de trabalho
- MEM – Meio essencial mínimo
- Mg⁺² – Magnésio
- NaCl – Cloreto de Sódio
- NaHCO₃ – Bicarbonato de Sódio

NMRC – *Naval Medical Research Center*
OMS – Organização Mundial da Saúde
ORF – *Open reading frame*
PBS – *Phosphate buffered saline*
PNI – Programa Nacional de Imunizações
POP – Procedimento operacional padronizado
PU – Procedimento de Uso
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
RNA – *Ribonucleic acid*
RPM – Rotações por minuto
SBI – Sociedade Brasileira Infectologia
SBIm – Sociedade Brasileira de Imunização
SBMT – Sociedade Brasileira Medicina Tropical
SBP – Sociedade Brasileira de Pediatria
SFB – Soro Fetal Bovino
SKIM MILK – Leite desnatado desidratado
SPC – *Statistical Process Control*
SUS – Sistema Único de Saúde
TRITON X-100 MW – surfactante não iônico
VERO – Células de rim de macaco
VOP – Vacina oral contra poliomielite

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	144
1.1 Aspectos históricos e epidemiológicos da dengue	14
1.2 Dengue: agente etiológico, vetores, transmissão, fisiopatologia e manifestações clínicas da doença.	17
1.3 Programa Nacional de Imunizações (PNI).....	20
1.4 Vacina da dengue.....	21
1.4.1 Recomendações prévias para a utilização da vacina da dengue	244
1.5 Controle de qualidade das vacinas.....	24
1.5.2 Uso de culturas de células em ensaios biológicos.....	266
2 JUSTIFICATIVA	28
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Amostras de vacinas	300
4.2 Cultura de células	30
4.2.1 Manutenção da linhagem celular VERO.....	30
4.2.2 Preparo e fornecimento da suspensão celular VERO	311
4.2.3 Preparo do meio de diluição da vacina	32
4.3 Preparação da microplaca de 96 poços	322
4.4 Preparação da diluição seriada em megaplaca.....	333
4.5 Distribuição das diluições virais para titulação em microplacas	344
4.6 Fixação das células vero com acetona.....	355
4.7 Coloração	355
4.8 Leitura da placa e cálculo do título infeccioso	366
4.9 Critérios do ensaio	37
4.10 Construção do gráfico controle pelo software SPC Explorer RT (Statistical Process Control)	377
5 RESULTADOS	38
5.1 Ensaio de potência	38
5.2 Cálculo das potências	400

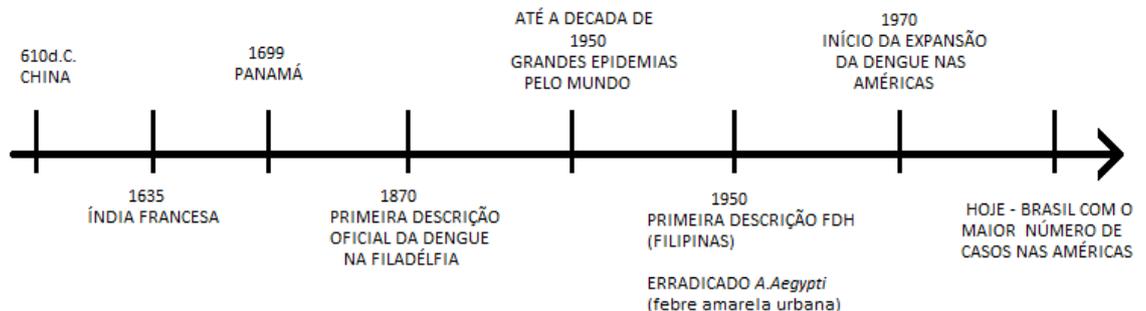
5.3 Controle sistemático do lote através do gráfico controle	422
5.4 Controle sistemático do lote através do gráfico controle	444
6 DISCUSSÃO.....	455
7 CONCLUSÃO.....	48
8 PERSPECTIVAS.....	49
REFERÊNCIAS	500
APÊNDICE A – MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES	544
APÊNDICE B – PREPARO DAS SOLUÇÕES	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos históricos e epidemiológicos da dengue

A dengue é uma doença febril, aguda de etiologia viral causada por qualquer um dos quatro sorotipos virais, que podem ocasionar infecção assintomática, febre branda, febre hemorrágica da dengue ou síndrome de choque por dengue (BRASIL, 2002). As primeiras descrições do quadro clínico compatível com essa enfermidade foram registradas em uma enciclopédia chinesa há 610 d.C, e conseguinte a esse período, surtos epidêmicos de febre aguda da doença surgiram no Oeste da Índia Francesa e no Panamá se disseminando pelo mundo, como mostra a linha do tempo apresentada na figura 1 (BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

Figura 1 - Linha do tempo dos aspectos históricos e epidemiológicos de registros e evolução da Dengue pelo mundo.



Fonte: (BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

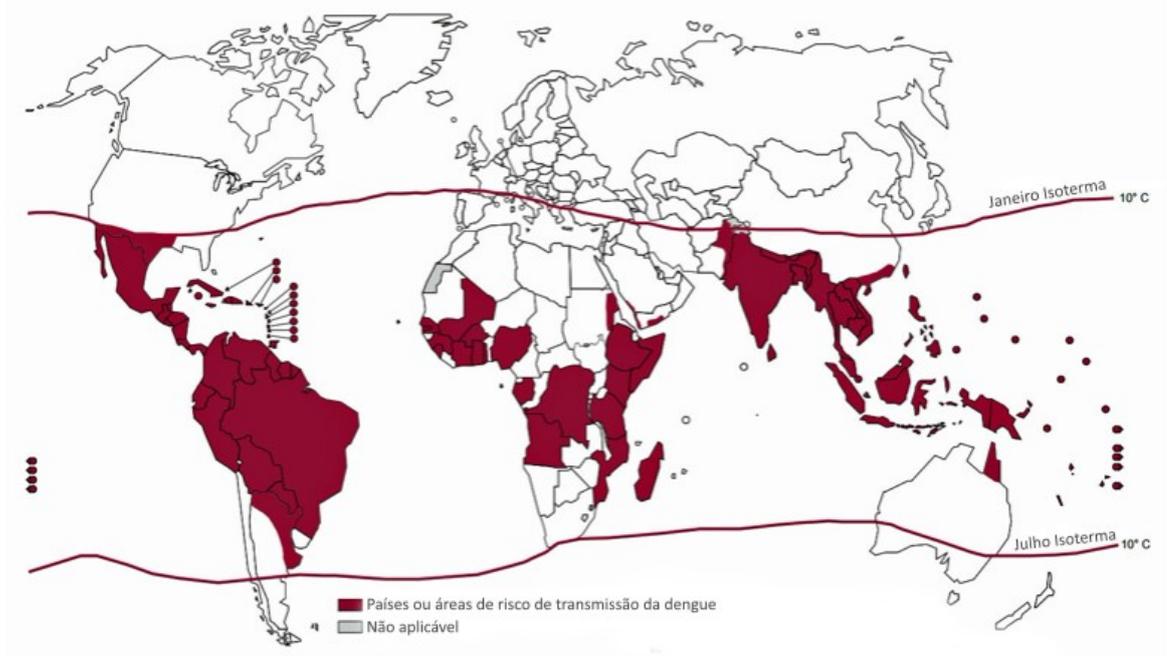
A dengue é a mais importante arbovirose (doença transmitida por artrópodes) que afeta o homem e constitui-se em sérios problemas de saúde pública no mundo, especialmente em países tropicais e subtropicais, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do *Aedes aegypti*, principal mosquito vetor (BRASIL, 2002). Esta espécie de artrópode é originária da África Subsaariana, onde se domesticou e se adaptou ao ambiente criado pelo homem, tornando-se antropofílico, sendo suas larvas encontradas em depósitos artificiais (TEIXEIRA; BARRETO; GUERRA, 1999).

A doença apresenta-se nos grandes centros urbanos de várias regiões do mundo, inclusive do Brasil, sob a forma de epidemias, e hiperendêmica nos lugares onde um ou mais sorotipos circularam anteriormente. Ao longo dos três últimos séculos, tem-se registrado a ocorrência da dengue em várias partes do mundo, com pandemias e epidemias isoladas,

atingindo as Américas, a África, a Ásia, a Europa e a Austrália (TEIXEIRA; BARRETO; GUERRA, 1999).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), grande parte desses acontecimentos são resultados das mudanças climáticas que geram um aumento da exposição acarretando uma ameaça grave às áreas que não sofrem com a dengue endêmica até o momento. Diante destes fatos, há um monitoramento prévio de todas as áreas vulneráveis a dengue todo ano, apontando os locais críticos, e onde o vírus pode se tornar perigoso como ilustra a Figura 2 (OMS, 2009).

Figura 2 - Mapa da Organização Mundial da Saúde que apresenta as áreas vulneráveis a dengue em todo o planeta.



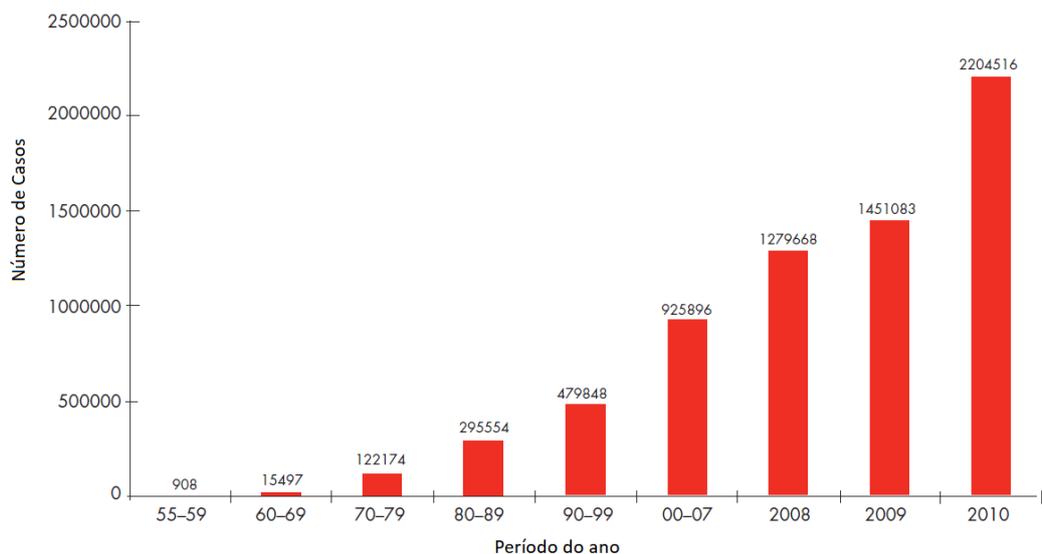
Fonte: (OMS, 2009).

Em 1998, 17 países notificaram casos de dengue nas Américas, sendo os principais países com o maior número de casos, o Brasil com 559.285, Colômbia com 63.182 e, Venezuela apresentando 37.586 casos notificados com proporção muito variável de casos hemorrágicos (de 0,02% a 15,2%). Estas variações podem ser imputadas a múltiplos fatores, destacando-se o número de sorotipos e o tempo em que estão circulando em cada espaço; à proporção das epidemias de dengue clássica anteriores e atuais que determinam o estado imunológico das populações expostas a novas infecções; às diferenças genéticas entre as cepas; aos atributos pessoais como idade e raça dos indivíduos; às diferenças nos critérios de

classificação diagnóstica das formas de dengue que confere maior ou menor sensibilidade ao sistema de detecção de casos, bem como à qualidade e cobertura dos sistemas de saúde de cada país (TEIXEIRA; BARRETO; GUERRA, 1999).

Segundo a OMS houve um aumento de casos notificados na década de 1996-2005 de 0,4 para 1,3 milhão, atingindo 2,2 milhões em 2010 e 3,2 milhões de casos em 2015 como mostra a Figura 3. Estima-se que ocorram anualmente no mundo cerca de 50 a 100 milhões de casos sintomáticos, 3,2 milhões de casos graves e nove mil mortes, a maioria ocorrendo em países em desenvolvimento (BHATT, 2013; OMS, 2012).

Figura 3 - Número médio de casos de dengue e dengue grave registrado anualmente à OMS entre 1955–2007 e o número de casos relatados nos últimos anos, 2008-2010.



Fonte: (OMS, 2012).

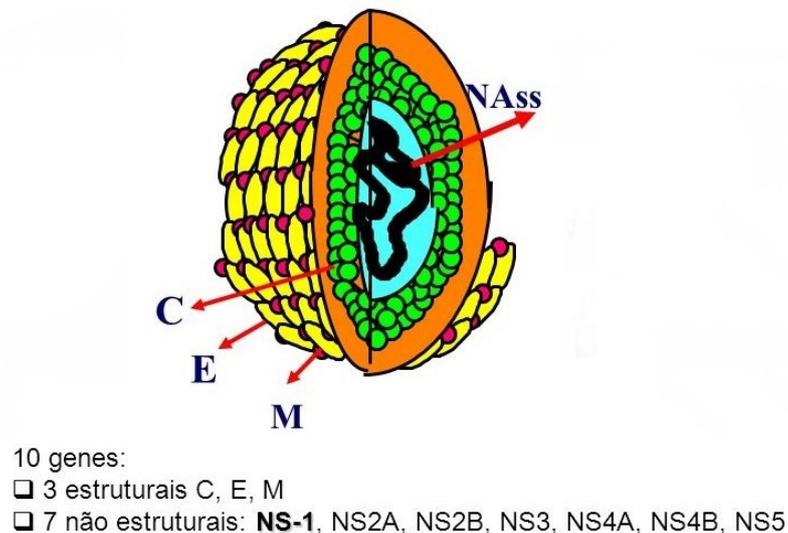
Indicadores como carência de serviços e saneamentos básicos, tais como água canalizada, esgoto, remoção de lixo e alta densidade populacional, condicionam a uma propagação massiva da doença, suscitando a índices graves da dengue (GUBLER, 1998). Em paralelo a isso, as terapias utilizadas para o manejo da doença, até o presente momento, não estão disponíveis, se limitando apenas ao controle de vetores através de medidas de proteção pessoal como remoção da água estagnada, destruição de pneus velhos e latas que servem como criadouros de mosquito. Ou podem ser utilizados métodos que limitam o contato homem-vetor como mosquiteiros, telas nas janelas das casas ou roupas de proteção. Também são utilizados parasitas, patógenos ou predadores naturais tais como *Bacillus thuringiensis israelensis* (BTI) ou peixes que comem as larvas do mosquito como *Gambusia affinis*, e uso

de inseticidas para controlar as diferentes fases dos insetos, mas todas estas medidas com poucos dados para apoiar seu impacto na doença clínica. Assim, o desenvolvimento de uma vacina contra dengue segura e eficaz foi um grande avanço no controle da doença (ACHEE *et al.*, 2015; VANNICE; ROEHRIG; HOMBACH, 2015).

1.2 Dengue: agente etiológico, vetores, transmissão, fisiopatologia e manifestações clínicas da doença.

O vírus da dengue é um arbovírus do gênero *Flavivirus* pertencente à família *Flaviviridae*. É caracterizado por apresentar um ácido ribonucleico (RNA) de filamento único e, seu genoma apresenta uma fita única de RNA com um único sítio de início de leitura (ORF). O ORF é traduzido em uma única poliproteína, que é clivada pelas proteases do vírus e da célula infectada em 10 proteínas: três estruturais e sete não estruturais, conforme ilustrado na Figura 4 (SILVA; RICHTMANN, 2006).

Figura 4 - Estrutura do vírus da Dengue



Fonte: (<https://fernandobraganca.com.br/2016/08/01/vacina-contra-a-dengue-entre-9-e-45-anos/>).

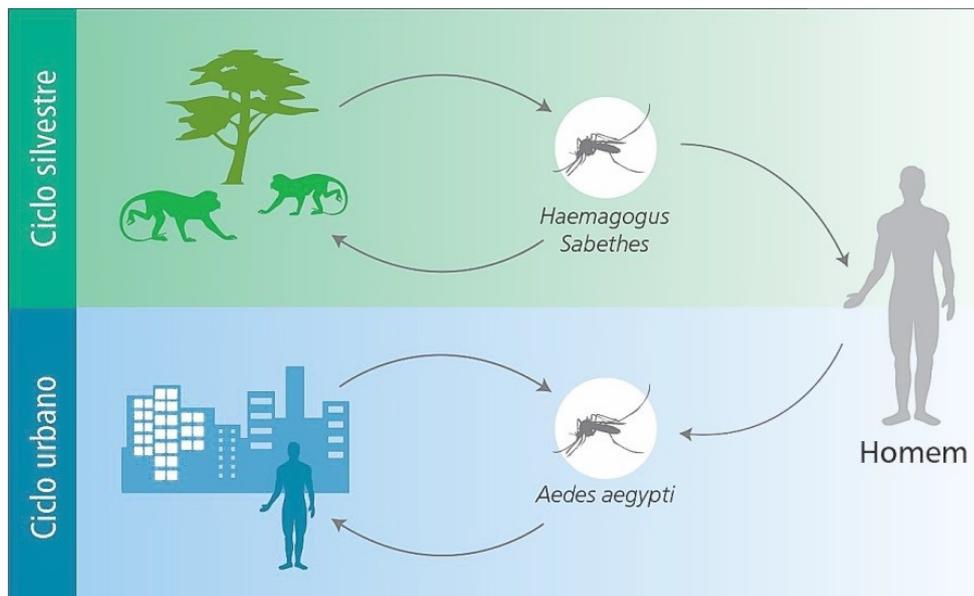
O vírus da dengue é composto por quatro diferentes sorotipos, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Todos os quatro sorotipos já foram sequenciados. Cada sorotipo proporciona imunidade permanente específica e imunidade cruzada em curto prazo, e todos os sorotipos podem causar doenças graves e fatais. Existe variação genética dentro de cada sorotipo, com pelo menos cinco genótipos descritos para o sorotipo DENV-1, cinco para o

DENV-2, quatro para o DENV-3 e dois para o DENV-4, e são essas variantes genéticas que caracterizam as diferenças de virulências e potencial epidêmico apresentadas em cada sorotipo (SILVA; RICHTMANN, 2006).

Os vetores são artrópodes da espécie *A. aegypti*, responsável pela transmissão da dengue nas Américas, e *A. albopictus*, outra espécie considerado vetor secundário da dengue. Nas últimas décadas espalhou-se pela Ásia, África, América e Europa. (OMS, 2017a; BRASIL, 2002).

A transmissão se faz pela picada da fêmea do *A. aegypti* ou *A. albopictus* em um indivíduo já infectado pelo vírus da dengue. Ao picar uma pessoa sadia, o mosquito (fêmea) infectado transmite a doença desencadeando assim um ciclo: homem (com viremia) - *A. aegypti* - homem, como explicitado na Figura 5. No ciclo urbano, o homem é o único hospedeiro com importância epidemiológica e a transmissão ocorre a partir de vetores urbanos infectados (BRASIL, 2002).

Figura 5 - Ciclo epidemiológico da Dengue



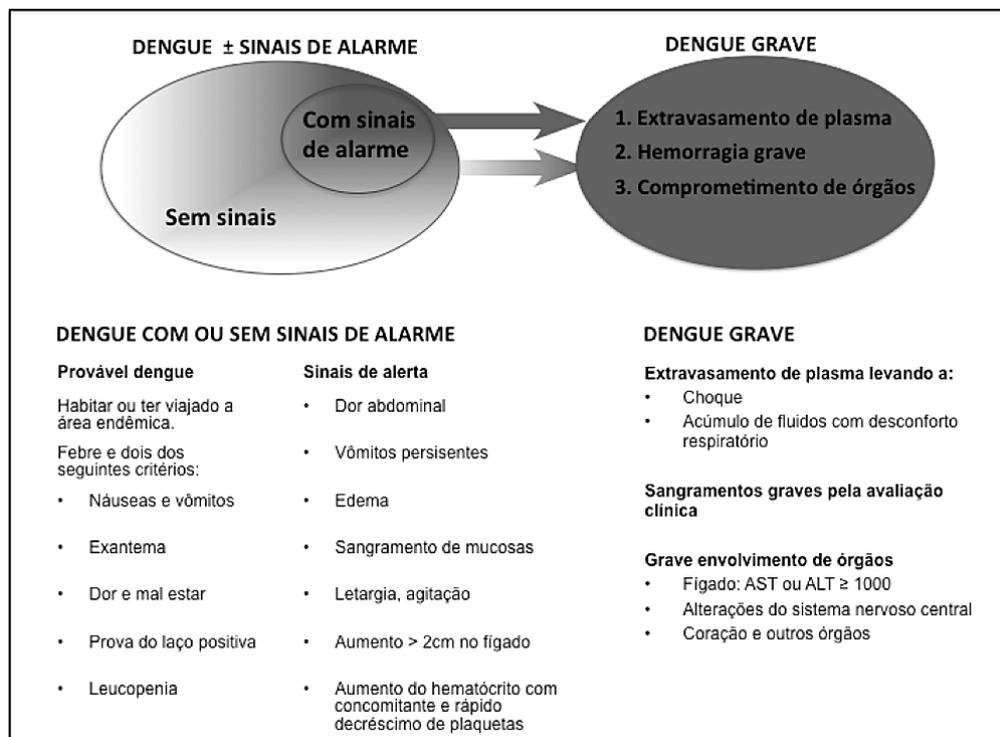
Fonte: (BRASIL, 2002).

Após um repasto de sangue infectado, o mosquito fica apto a transmitir o vírus, depois de dois a 10 dias de incubação. A transmissão mecânica também é possível, quando o repasto é interrompido e o mosquito, imediatamente, se alimenta num hospedeiro suscetível próximo. Não há transmissão por contato direto de um doente ou de suas secreções com uma pessoa sadia, nem de fontes de água ou alimento (BRASIL, 2002).

O período de incubação varia de três a dias e, o período de transmissibilidade ocorre enquanto houver presença de vírus no sangue do homem. Após a picada do mosquito, a infecção pelo vírus se dá através da infecção de monócitos e células dendríticas (células da linhagem dos fagócitos mononucleados) com subsequente apresentação dos antígenos virais aos linfócitos T para o estabelecimento de resposta imunológica (MASSAD, 2003).

A infecção pelo vírus da dengue causa uma doença cujo espectro inclui desde infecções inaparentes até quadros de hemorragia e choque, podendo evoluir para o êxito letal. Estes dois aspectos clínicos, apresentados na Figura 6, são classificados em dengue com ou sem sinais de alarme e dengue grave de acordo com a OMS (OMS, 2009).

Figura 6 - Classificação dos casos de dengue pela gravidade



Fonte: (OMS, 2009).

A sintomatologia dos indivíduos que adquiriram a doença varia de acordo com os aspectos clínicos apresentados na *Figura 6*. Desta forma, é necessário averiguar de forma incisiva e se atentar as manifestações clínicas para se obter um diagnóstico e tratamento adequado. O diagnóstico pode ser feito através do isolamento do agente ou pelo emprego de métodos sorológicos - demonstração da presença de anticorpos da classe imunoglobulina M (IgM) em única amostra de soro ou aumento do título de anticorpos da classe imunoglobulina G (IgG) em amostras pareadas (conversão sorológica). O isolamento é o método mais específico para determinação do sorotipo responsável pela infecção. A coleta de sangue deve

ser realizada de preferência no terceiro ou quarto dia do início dos sintomas. Após o término dos sintomas não se deve coletar sangue para o isolamento viral. Os testes sorológicos complementam o isolamento do vírus e a coleta de amostra de sangue deverá ser feita após o sexto dia do início da doença (BRASIL, 2002).

1.3 Programa Nacional de Imunizações (PNI)

O PNI, criado em 1973, tem por característica coordenar as ações de imunização no país, antes organizadas em programas de controle de doenças. O primeiro calendário nacional de vacinação foi divulgado em 1977, através da Portaria nº 452/77, normatizando vacinas como: tríplice bacteriana (DTP), contra difteria, tétano e coqueluche; vacina Bacilo Calmette-Guerin (BCG), contra tuberculose; vacina monovalente contra sarampo; e vacina oral contra poliomielite (VOP) (DOMINGUES; TEIXEIRA, 2013; BRASIL, 2013).

A implementação do PNI, possibilitou a multivacinação, contribuindo para redução das desigualdades regionais e sociais, bem como a garantia de uma autossuficiência na produção nacional, favorecendo o fortalecimento do Complexo Industrial da saúde, na qual os principais insumos são produzidos por laboratórios públicos e, desenvolvidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2013; DOMINGUES; TEIXEIRA, 2013; CARVALHO, 2005). O PNI corrobora fundamentalmente para a erradicação de doenças como, poliomielite, sarampo, rubéola, tétano neonatal, dentre outras (BRASIL, 2016; DOMINGUES; TEIXEIRA, 2013;).

O PNI para além de assegurar uniformidade no calendário vacinal, permite a padronização da técnica, adoção de estratégias inovadoras, como a combinação da vacinação de rotina através das campanhas de vacinação e introduz sustentavelmente a produção de novas vacinas. Congruente a estes benefícios, o PNI também promove o desenvolvimento de estudos que avaliam impacto das vacinas na morbimortalidade e realiza a vigilância de eventos adversos, complementando assim a extensa cadeia de garantia da qualidade dos imunobiológicos utilizados (SILVA JÚNIOR, 2013).

O Brasil é um dos países que mais oferecem imunobiológicos, de forma gratuita, à população-alvo. Atualmente no país, são ofertados produtos como: vacinas, soros e imunoglobulinas, de acordo com a relação de produtos disponibilizados pela Coordenação-Geral do PNI (DOMINGUES; TEIXEIRA, 2013; SILVA JÚNIOR, 2013).

Além das vacinas que compõem o calendário, outras se encontram disponíveis nos Centros de Referência de Imunobiológicos Especiais para portadores de condições clínicas

especiais, tais como: gestantes, povos indígenas, pessoas em tratamento contra o câncer, pacientes crônicos, entre outros (DOMINGUES; TEIXEIRA, 2013).

1.4 Vacina da dengue

Atualmente, o desenvolvimento de uma vacina tetravalente contra a dengue é a principal estratégia para se obter uma vacina eficaz na prevenção da doença (GAILHARDOU *et al.*, 2016; BHAMARAPRAVATI; SUTEE, 2000).

A primeira vacina da dengue licenciada no Brasil ocorreu em dezembro de 2015 pelo laboratório Sanofi Pasteur (Dengvaxia®). Essa vacina também foi aprovada por outras agências em 11 países distribuídos pela Ásia e América Latina (OMS, 2012).

A vacina caracteriza-se por apresentar os quatro vírus vivos atenuados da Dengue, recombinantes, quimérica, que utiliza como estrutura básica o vírus vacinal da febre amarela baseada no esqueleto YF17D (CYD-TDV), havendo substituição dos genes responsáveis pela codificação das proteínas pré-membranas (prM) e do envelope (E), por cada um dos quatro sorotipos do vírus da dengue na matriz estabelecida. (SABECHAREON *et al.*, 2012).

Para além desta vacina, existem outras candidatas caracterizadas por serem de vírus vivo atenuado e inativado, proteína recombinante e vacina de ácido desoxirribonucléico (DNA). Todas estas vacinas são tetravalentes, apresentando os quatro sorotipos, e foram testadas através de ensaios clínicos conforme a Tabela 1 (SILVA; RICHTMAN, 2006).

Tabela 1 - Vacinas em desenvolvimento e registradas.

VACINA TETRAVALENTE	TIPO DA VACINA	PRODUTOR
Dengvaxia - Genes prM e E dos quatro sorotipos do vírus da dengue inseridos em uma porção não-estrutural do vírus vacinal da febre amarela 17D.	Vírus vivo atenuado	Sanofi-Pasteur®
TDV - Genes prM e E dos quatro sorotipos do vírus da dengue inseridos em uma porção não-estrutural do vírus DEN-2 (16681, PDK 53) atenuado.	Vírus vivo atenuado	Takeda
TV 003/TV 005 - Genes prM e E dos vírus da dengue DEN-1, DEN-2 e DEN- 3 inseridos no vírus DEN-4 atenuado por deleção de nucleotídeos específicos	Vírus vivo atenuado	National Institute of Health – NIH e Instituto Butantan
V180 – Proteínas de pré-membrana e de envelope produzidas através do sistema de expressão das células de <i>Drosophila</i>	Proteína recombinante	Merck
TVDV – Proteínas da pré-membrana e do envelope do DENV-1,2,3,4 expressas sob o controle do promotor-potencializador do citomegalovírus humano do vetor de plasmídeo VR1012	DNA	Naval Medical Research Center (NMRC)
TDENV PIV – Vacina de vírus inativado purificado	Vírus Inativado	GSK

Fonte: (SILVA; RICHTMAN, 2006; www.denguevaccine.org)

As análises da vacina quanto à eficácia e segurança de acordo com Gailhardou e colaboradores (2016) se mostraram bastante eficazes na prevenção da doença, especialmente em resposta aos ensaios clínicos de fase I, II, III, realizado em indivíduos entre dois a 60 anos na Ásia e na América Latina. Dados desse estudo apontam algumas reações locais na aplicação da vacina, tal como dor, e reações adversas sistêmicas como dores de cabeça e mal-estar. Nenhuma reação anafilática relacionada à vacina, eventos neurotrópicos ou efeitos viscerotrópicos foram relatados.

Durante o terceiro ano de acompanhamento dos indivíduos deste estudo apresentado por Gailhardou e colaboradores (2016), foi observado um risco maior de hospitalização por dengue no grupo de crianças menores de nove anos de idade que receberam a vacina Dengvaxia®. Diante desta circunstância, foi ressaltado um risco maior no grupo de crianças nessa faixa etária, o que sugeriu a hipótese de que a vacina para este caso induziria a uma primo-infecção pelo vírus da dengue, proporcionando uma proteção de curto prazo após a administração da vacina a esse grupo, com perda de imunidade protetora ao longo do tempo (GAILHARDOU *et al.*, 2016).

O laboratório Sanofi Pasteur apresentou dados comparativos que demonstraram distinção no que tange respeito à segurança e eficácia da vacina Dengvaxia® de acordo com o estado sorológico prévio à vacinação. A vacina apresentou uma eficácia global confirmada contra qualquer sorotipo da dengue de 65,6% na população acima de nove anos de idade. A eficácia nessa população foi de 58,4% contra o sorotipo 1, 47,1% contra o sorotipo 2, 73,6% contra o sorotipo 3 e de 83,2% contra o sorotipo 4. Se considerarmos a forma da dengue que leva à hospitalização, a eficácia verificada da vacina foi de 80,8%. Ou seja, há uma proteção maior para casos de dengue considerados mais severos, que levam à internação dos pacientes (ANVISA, 2015).

Também foi observado no primeiro grupo (soronegativos) que a resposta à primeira infecção após a vacinação (na fase de perda de imunidade protetora), atuara como uma segunda infecção pelo vírus, gerando assim um risco maior de formas mais graves da doença e hospitalização. Já para o segundo grupo (soropositivos), após a primeira infecção pós-vacinação, a resposta observada foi similar a infecções pós-secundárias sem risco de formas mais graves da doença (DANS *et al.*, 2018; ANVISA, 2015; SANOFI PASTEUR, [S.d.]).

O estudo apontou que indivíduos que receberam a vacina e nunca tiveram contato anterior com o vírus apresentaram um risco 0,5% maior de hospitalização e 0,2% para dengue grave, em comparação às pessoas vacinadas previamente infectadas (ANVISA, 2015). Esta avaliação delinea o benefício e a segurança da vacinação de indivíduos previamente expostos (soropositivo), reduzindo-se assim o número de hospitalização e casos graves da doença nesse grupo de indivíduos (ANVISA, 2015).

A vacina (uma dose – 0,5 mL) é composta por um pó liofilizado injetável e diluente para suspensão, contendo após sua reconstituição, o valor de potência de 4,5 – 6,0 log₁₀ DICC50/dose (*50% cell culture infectious dose* – em inglês, ou dose infectante de 50% da cultura celular) para os quatro sorotipos. A mesma é produzida em células VERO sem soro onde cada um dos quatro sorotipos do vírus da dengue contidos na vacina foi obtido separadamente por tecnologia de DNA recombinante, combinando o vírus atenuado da vacina febre amarela (17D204) e os quatro sorotipos dos vírus selvagens da dengue. Seu esquema terapêutico é de três doses, com intervalo de seis meses entre cada uma, sendo indicada para indivíduos com idade entre 9 – 45 anos que residem em áreas endêmicas, e contraindicadas para gestante, e pessoas com sistema imunológico comprometido (SANOFI PASTEUR, [S.d.]).

1.4.1 Recomendações prévias para a utilização da vacina da dengue

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em conjunto com a Sociedade Brasileira de Imunização (SBIIm), Pediatria (SBP), Infectologia (SBI) e Medicina Tropical (SBMT), e a Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO), alinharam recomendações fundamentais com o intuito de orientar a comunidade médica em geral sobre a segurança e eficácia da Vacina Dengvaxia® (OMS, 2017b):

- A Anvisa recomenda a aplicação da vacina Dengvaxia® em adultos, adolescentes e crianças dos nove aos 45 anos de idade que moram em áreas endêmicas; e a não utilização da vacina em indivíduos soronegativos, ou seja, a vacina Dengvaxia® não deve ser administrada em indivíduos que não tenham sido previamente infectados pelo vírus da dengue;
- Deve-se haver uma avaliação individualizada para os indivíduos que iniciaram e ainda não completaram o esquema vacinal e desconhecem seu *status* sorológico prévio à vacinação;
- Deve-se avaliar o risco e benefício da vacina nos casos da utilização das mesmas em programas públicos, uma vez que em regiões de alta endemicidade o benefício da imunização superará o risco atribuível à vacinação dos soronegativos, já que as infecções primárias deverão correr independentemente da vacinação;
- Aprimoramento do sistema de vigilância e monitoramento da eficácia e segurança da vacina em programas públicos;
- Indivíduos soronegativos para dengue e/ou sem conhecimento prévio do seu *status* sorológico que foram vacinados devem ser monitorados com maior atenção.

1.5 Controle de qualidade das vacinas

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n.º 73/2008 da Anvisa, que dispõe sobre o Regulamento Técnico para procedimento de liberação de lotes de vacinas para consumo no Brasil, é delegada ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz) a responsabilidade pela liberação de todos os lotes de vacinas utilizadas no país. Desta forma, o INCQS/Fiocruz desempenha um importante papel dentro e fora do PNI, tanto por analisar os lotes de vacinas adquiridas pelo programa, quanto pelo seu caráter consultivo ao Ministério da Saúde na identificação de prioridades, formulação de diretrizes nacionais nas áreas de pesquisa, produção, aquisição,

distribuição e utilização de imunobiológicos, fundamentado em avaliações sistemáticas e em dados técnico-científicos atualizados (BRASIL, 2008).

O controle de qualidade oficial dos imunobiológicos utilizados no Brasil iniciou-se em 1973, por determinação do Ministério da Saúde, com a institucionalização do PNI (BRASIL, 2013).

Nesse contexto, em 1983, o INCQS/Fiocruz como órgão público federal que atende ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, assumiu a responsabilidade pelo controle oficial da qualidade de todos os lotes de imunobiológicos a serem utilizados pelo PNI (TEMPORÃO; NASCIMENTO; MAIA, 2005; PONTE, 2003;).

A utilização de imunobiológicos carregou consigo a necessidade severa da implementação do controle de qualidade dos produtos, a fim de garantir a qualidade, segurança, eficácia e credibilidade dos mesmos junto ao mercado consumidor (NETTO, 2010).

As vacinas privadas, ou seja, aquelas que não são contempladas ao PNI, são submetidas apenas a análise documental, através de uma avaliação crítica do protocolo de produção e controle das diversas etapas do processo de fabricação, desde a aquisição da matéria prima até o produto final. Deve-se cumprir para além destas, as determinações impostas pela Anvisa, definidas pela RDC nº 17, de 16 de abril de 2010, que dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos de uso humano, e da Farmacopeia específica do produto (CARVALHO, 2014; BRASIL, 2010; NETTO, 2010;).

O controle de qualidade de vacinas é realizado pelo laboratório de origem e posteriormente submetido à análise do INCQS/Fiocruz, que através de ensaios biológicos, utilizando ou não cultura celular, é avaliada a eficácia do produto (ensaios de identidade, estabilidade e potência) e segurança (testes de esterilidade, toxicidade e pirogênio ou endotoxina bacteriana) (CARVALHO, 2014; NETTO, 2010).

1.5.1 Ensaios de Potência

Os ensaios de potência da vacina consistem na avaliação do seu potencial de indução de imunidade protetora pós-administração. 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 da dengue, tais ensaios adotam as recomendações técnicas da OMS e são fundamentados na infectividade das culturas de células frente aos quatro sorotipos de

vírus presentes na vacina (OMS, 2006). O ensaio é avaliado através da presença ou ausência do efeito citopático nas culturas celulares, apresentando alterações imunocolorimétricas ocasionadas pela presença do vírus específico para cada sorotipo, sendo o título viral expresso em \log_{10} DICC₅₀ por dose.

1.5.2 Uso de culturas de células em ensaios biológicos

A técnica de cultura celular é caracterizada pela manutenção de células vivas em laboratório, organizadas e acopladas em recipientes estéreis, permitindo assim a extensão da técnica de cultura em tecido. A cultura de células em laboratórios tem como um dos objetivos possibilitar a realização de ensaios de potência e termoestabilidade de vacinas (MIGITA, 2012).

Esta prática tornou-se primorosa e eficiente no âmbito de pesquisas biomédicas e biotecnológicas, uma vez que são modelos biológicos mais simples quando comparados a animais de experimentação (MIGITA, 2012).

A cultura celular traz diversas vantagens para o desenvolvimento de trabalhos científicos, mas assim como qualquer outra técnica, uma vez que contaminações cruzadas são comumente apresentáveis. Outro ponto marcante são os meios ricos em nutrientes utilizados para o crescimento celular, que também propiciam o crescimento de diversos organismos. Desta forma, é necessária uma condição estéril para que o crescimento aconteça de forma adequada e controlada (ALVES; GUIMARÃES, 2018).

Existem diversas aplicações para as quais a cultura celular pode ser empregada para obtenção viral, fins diagnóstico de doenças para análise de alvos farmacológicos e produção de produtos biológicos, como por exemplo: imunobiológicos e anticorpos monoclonais (FRESHNEY, 2006; MIGITA, 2012).

O emprego de culturas celulares em ensaios biológicos requer conhecimento prévio das linhagens criopreservadas. As células devem se encontrar em perfeitas condições de armazenamento e controle diário. Cada célula é específica para um determinado ensaio a que se propõe realizar. Desta forma, devem ser adequadas e cultivadas conforme a necessidade e especificidade de cada ensaio (ALVES; GUIMARÃES, 2018).

O banco de células do INCQS/Fiocruz tem seu arcabouço baseado na aquisição de linhagens celulares oriundas de diferentes bancos celulares centrais, tais como a ATCC (*American Type Culture Collection*), Coleção Europeia de Culturas de Células Autênticas do inglês *European Collection of Authenticated Cell Cultures* – ECACC, e BCRJ (*Banco de*

Células do Rio de Janeiro). Os tubos de linhagens celulares certificadas e autenticadas adquiridas desses polos são denominados por células sementes, que são criopreservadas de acordo com as especificações estabelecidas pelo POP (Procedimento Operacional Padrão) do Setor de Cultura de Células do INCQS/Fiocruz. Deve-se realizar um monitoramento periódico das culturas em uso, uma vez que o risco de contaminação cruzada é comum e as condições de cultivo devem ser controladas. Cada célula exige um meio de cultura específico, contendo o substrato adequado de modo a fornecer os nutrientes necessários às células para que as mesmas possam se desenvolver, além da manutenção de um ambiente físico-químico ideal (temperatura, pH e umidade adequados) (ALVES; GUIMARÃES, 2018; MIGITA, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

O controle de qualidade aplicado a imunobiológicos é uma das ferramentas mais importantes no processo de fabricação/produção de vacinas, auxiliando no processo de implantação de um sistema de qualidade e aperfeiçoamento de produtos (ROCHA; GALENDE 2018; PONTE, 2003).

Nesse contexto, o INCQS/Fiocruz é o Instituto responsável pelo controle de qualidade das vacinas utilizadas no Brasil. O Instituto é composto por diversos departamentos, dentre os quais, está o departamento de Imunologia (DI) composto pelo laboratório de Vacinas Virais, Biofármacos e Cultura de Células que é um dos quais realizam o controle de qualidade das vacinas.

A avaliação da potência, termoestabilidade, eleição e análise de carta controle das vacinas de referência se dão através de ensaios biológicos (ALMEIDA, 2014; SANTOS, 2010).

Cartas (ou gráficos) de controle são utilizadas para monitorar e acompanhar o desempenho de um processo de medição. Estes gráficos determinam estatisticamente uma faixa denominada limites de controle composto pela linha superior (limite superior de controle), uma linha inferior (limite inferior de controle), e uma linha média. O objetivo desta ferramenta é verificar, por meio do gráfico, se o processo está dentro dos limites permissíveis, apontando causas especiais de variação para que medidas corretivas sejam aplicadas (DE OLIVEIRA, 2013).

Assim, a relevância deste trabalho fundamenta-se no fato de que a elaboração de uma carta controle da vacina de referência da dengue, produzida pelo laboratório Sanofi Pasteur, é necessária para garantia da qualidade dos resultados, uma vez que a vacina de referência é analisada em paralelo com a amostra teste, e a obtenção de resultados dentro de limites pré-estabelecidos é obrigatório para a validade dos resultados dos testes de potência e termoestabilidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Elaborar uma carta controle da vacina de referência para utilização nos ensaios de potência da vacina da dengue.

3.2 Objetivos específicos

- Estimar o título da vacina da dengue através de ensaios de potência;
- Realizar o controle sistemático dos resultados da potência da vacina de referência utilizando o gráfico controle.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras de vacinas

As amostras das vacinas tetravalentes da dengue fabricadas pelo produtor Sanofi Pasteur, foram armazenadas e mantidas a uma temperatura de 2 a 8°C, e foi utilizado apenas um lote para a realização dos ensaios. Toda a metodologia foi realizada de acordo com POP descrito pelo laboratório fabricante Sanofi Pasteur.

4.2 Cultura de células

Foram utilizadas culturas de células de linhagens VERO (células aderentes epiteliais de rim de macaco verde africano), cuja manutenção e preparo seguem o PU.3430.057 (INCQS, 2018) do Setor de Cultura de Células, do DI, INCQS. Este procedimento de uso visa padronizar a manutenção e o fornecimento da linhagem VERO, oriunda da Sanofi Pasteur utilizada no DI em ensaios de determinação de potência e termoestabilidade da vacina contra Dengue do fabricante Sanofi Pasteur.

As marcas e especificações dos insumos utilizados se encontram descritos nos *Apêndices A e B*.

4.2.1 Manutenção da linhagem celular VERO

A manutenção da linhagem celular se deu a partir de 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 utilizado na rotina de ensaios realizados no INCQS/Fiocruz entre as passagens 142 e 150 após o descongelamento das ampolas do LT, sendo esta uma obrigatoriedade para o controle de qualidade dos ensaios.

Para a manutenção celular foram seguidas as recomendações conforme o POP 65.3430.031 que disserta sobre a manutenção de linhagens celulares animais com peculiaridades que serão descritas ao longo desta metodologia (INCQS, 2017).

As culturas foram mantidas com o Meio Essencial Mínimo (MEM) com 5% Soro Fetal Bovino (SFB), na qual sua preparação e suplementação foram realizadas de acordo com as especificações na tabela que se encontra no Apêndice A, em estufa umidificada a 37 °C ± 1°C, 5 % CO₂ ± 1 % CO₂.

Para a realização do subcultivo (passagem) da linhagem celular foi retirado o meio de cultura e lavada a monocamada duas vezes com solução de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) [1x] sem Ca^{+2} e sem Mg^{+2} . O PBS foi diluído previamente antes de ser utilizado conforme especificações da tabela no Apêndice A.

Após a lavagem inicial com PBS foi adicionada solução de Tripsina Versane EDTA preparada anteriormente de acordo com as concentrações apresentadas na tabela no Apêndice A. A quantidade de tripsina utilizada varia de modo a preencher superficialmente toda a monocamada da garrafa. Incubou-se por dois minutos a uma temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para que a monocamada se desprendesse com mais facilidade.

Após o desprendimento da monocamada, foi adicionada uma alíquota do meio MEM 5% SFB, previamente preparado e mantido refrigerado para auxiliar na inibição da ação da tripsina.

As células foram dissociadas energeticamente por aspirações e liberações sucessivas da suspensão celular usando uma pipeta de volume adequado, e um *pool* das soluções contidas nas garrafas foi realizado.

A contagem das células foi realizada conforme PU 3430.057 (INCQS, 2018) e calculou-se o volume necessário a ser utilizado no subcultivo.

A preparação de novas garrafas seguiu as recomendações de acordo com o descrito na tabela no Apêndice A.

4.2.2 Preparo e fornecimento da suspensão celular VERO

Para a realização do ensaio de determinação de potência e termoestabilidade da vacina contra a Dengue, a linhagem celular fornecida deve estar entre as passagens número 142 e 150.

A cultura celular foi preparada e mantida em observação, e somente tripsinizada para o fornecimento os cultivos celulares que possuíam de quatro a cinco dias de crescimento conforme preconizado nas especificações.

O volume da suspensão foi transferido para um tubo de centrifuga de 50 mL e centrifugado (IEC – Centra MP 4R, USA) a 830 rotações por minuto (rpm) ($160 \times g$) / 10 min / 5°C / aceleração 5rpm/s/ desaceleração 5rpm/s. Após centrifugado, o sobrenadante foi desprezado e adicionados 10 mL de MEM 10% SFB conforme Apêndice A. Homogeneizou-se as células energeticamente por aspirações e liberações sucessivas da suspensão celular usando uma pipeta de volume adequado ou com uso de agitador de tubos.

A contagem celular foi realizada em duas diluições preparadas independente totalizando oito quadrantes. A suspensão celular foi fornecida em erlenmeyer de acordo com o volume necessário e concentração final de $3,0 \times 10^5 \pm 20\%$ células/ mL para a realização do ensaio. O meio foi preparado com formulação de 100 mL de MEM (10x) + 33 mL de solução de bicarbonato de sódio 5,6% (p/v) previamente filtrado para ajuste do pH. Foi adicionado 100 mL de SFB, 10 mL de 200 mM L-glutamina, 2 mL de Penicilina-Dihidrostreptomicina e avolumado para 1000 mL com água destilada estéril.

4.2.3 Preparo do meio de diluição da vacina

Para o preparo do meio empregado na diluição da vacina, foram utilizados 100 mL do meio MEM (10x) + Earle's-L-glutamina – NaHCO₃ previamente filtrado com 33 mL de solução de bicarbonato de sódio 5,6% (p/v) para ajuste do pH, suplementou-se também, 100 mL de SFB, 10 mL de 200 mM L-glutamina, 2 mL de Penicilina-Dihidrostreptomicina e avolumado para 1000 mL com água destilada estéril, acrescentando 20 mL de tampão 2 % de *hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid* (HEPES).

O meio depois de preparado ficou armazenado a uma temperatura de 2-8 °C.

4.3 Preparação da microplaca de 96 poços

Para a preparação da microplaca foi realizada a identificação das mesmas com a data do ensaio, nome do operador, tipo da amostra e sorotipo a ser titulado. Para cada sorotipo foi designado uma coloração diferente para melhor assimilação: para o sorotipo 1 – preto, sorotipo 2 – azul, sorotipo 3 – vermelho e para o sorotipo 4 – verde.

Após a identificação das placas, foram distribuídos 100 µL da suspensão celular previamente preparada na concentração de 3×10^5 cels/mL em 10% de SFB nas microplacas (Falcon, USA) de 96 poços da coluna 1 a 12, mantendo a coluna 11 da placa vazia. Posterior a essa ação, distribuiu-se 100 µL de meio de cultura previamente preparado nos poços da coluna 12, destinados ao controle negativo das células VERO. Incubaram-se as placas na estufa a uma temperatura de $36 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$, $5 \% \text{ CO}_2 \pm 1 \% \text{ CO}_2$, até a distribuição das diluições virais.

As vacinas liofilizadas foram reconstituídas com solução de NaCl e homogeneizadas, utilizando-as para o controle de validação.

As amostras não sofreram oscilações drásticas de temperatura antes do teste e após a reconstituição da vacina foi realizada a 1ª diluição.

4.4 Preparação da diluição seriada em megaplaca

Para a preparação da diluição seriada, utilizou-se o meio MEM 10% SFB com 2% de HEPES, o mesmo utilizado anteriormente para a distribuição do controle celular na microplaca. Foram realizadas duas pré-diluições utilizando uma micropipeta multicanal automática (Sartorius - Picus 1200, Brasil): A primeira de 10^{-1} na qual foram adicionados 100 μL da vacina reconstituída em 900 μL de meio de diluição, e a segunda de 10^{-2} onde foram adicionados 100 μL da diluição de 10^{-1} em 900 μL de meio de diluição. Consecutivo a isso, foi realizada uma diluição serial de $\frac{1}{4}$, onde foi adicionado 400 μL da diluição anterior (de 10^{-2}) em 1200 μL de meio de diluição, conforme apresentado na figura 7.

Figura 7 - Preparação da megaplaca de diluição para o ensaio de potência da vacina da dengue.

	1	2	3	4										
A	●	●	●	●	●	●	●	●						
B														
C														
D														
E														
F														
G														
H														

Pré-Diluição (10^x)

- 1 900 μL de meio + 100 μL da amostra
- 2 900 μL de meio + 100 μL da diluição 10^{-1}

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Diluição

- 2.6 1200 μL de meio + 400 μL da diluição 10^{-2}
- 3.2 1200 μL de meio + 400 μL da diluição $10^{-2.6}$
- 3.8 1200 μL de meio + 400 μL da diluição $10^{-3.2}$
- 4.4 1200 μL de meio + 400 μL da diluição $10^{-3.8}$
- 5.0 1200 μL de meio + 400 μL da diluição $10^{-4.4}$
- 5.6 1200 μL de meio + 400 μL da diluição $10^{-5.0}$
- 6.2 1200 μL de meio + 400 μL da diluição $10^{-5.6}$
- 6.8 1200 μL de meio + 400 μL da diluição $10^{-6.2}$

1 - controle de validação sorotipo 1
 2 - controle de validação sorotipo 2
 3 - controle de validação sorotipo 3
 4 - controle de validação sorotipo 4

Fonte: (SANOFI PASTEUR, 2018).

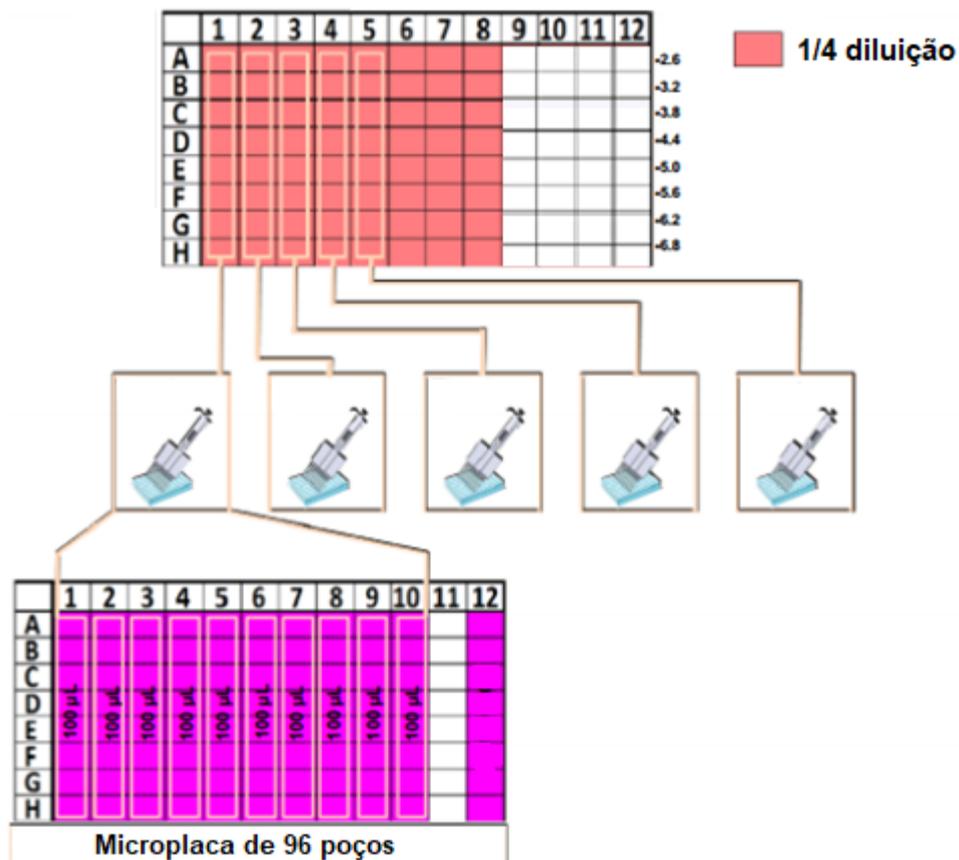
Depois de realizada esta primeira parte da pré-diluição, foi homogeneizado 800 μL cinco vezes e transferido 400 μL da última diluição obtida na diluição de 10^{-2} . Em seguida,

homogeneizou 400 μL da diluição dez vezes e transferiu-se de modo seriado para cada poço da megaplaca.

4.5 Distribuição das diluições virais para titulação em microplacas

Na etapa da diluição seriada preparada na megaplaca, e com o auxílio de uma micropipeta multicanal automática de volume (50 – 1200 μL) foi recolhido todo o volume da diluição da megaplaca da coluna 1 (sorotipo 1 – CV1) e distribuído 100 μL nas colunas de 1 a 10 da microplaca de 96 poços conforme a figura 8. Cada coluna da megaplaca preencheu uma microplaca correspondente ao sorotipo específico, com exceção da coluna 11 e do controle negativo da microplaca que não receberam a diluição preparada na megaplaca.

Figura 8 - Esquema de inoculação vertical das diluições da vacina na microplaca.



Fonte: (SANOFI PASTEUR, 2018).

Em outra microplaca foi distribuído o volume dos poços da coluna 2 da megaplaca (sorotipo 1 – CV2), e assim sucessivamente. A cada diluição as ponteiros foram trocadas e descartadas.

Após a inoculação das diluições, totalizando oito microplacas, cada uma delas foi coberta com filme adesivo (Corning, USA) e incubada em estufa a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2 \pm 1\% \text{ CO}_2$ por sete dias.

4.6 Fixação das células vero com acetona

Após sete dias de incubação das microplacas, as mesmas foram examinadas ao microscópio e descartado o meio por inversão em um recipiente para resíduos. Os poços foram fixados com aproximadamente 250 a 300 μL de 85% de acetona fria a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ e preparada previamente a solução contendo 1700 mL de acetona e avolumado para 2000 mL com água destilada, em uma cabine de segurança química.

As placas foram inoculadas a temperatura de $\leq -20^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos e, ao final deste tempo, toda a acetona foi removida dos poços por inversão em um recipiente para descarte de resíduos e retirado o excesso da solução através de leves batidas em papel adsorvente.

Após toda a acetona ser removida, as placas foram mantidas para secar em cabine de segurança biológica por 30 minutos, até que todos os poços estivessem devidamente secos para evitar o desprendimento das monocamadas de célula. Caso necessário, as placas foram mantidas por mais tempo nessa condição.

4.7 Coloração

No procedimento de coloração, duas soluções foram preparadas: a primeira foi a solução do Tampão de Lavagem contendo, 100 mL de PBS (10X) sem Ca^{+2} e Mg^{+2} ; 0,5 mL de Tween 20 e avolumou-se para 1000 mL com água destilada. Em seguida foi preparada a solução do tampão de saturação, contendo 2,5g de Skimmilk; 0,5 mL de Triton X-100 MW 647; e 100 mL de Tampão de Lavagem, e mantida sob agitação magnética para se obter uma solução homogênea antes do uso. Foram distribuídos 100 μL do tampão de saturação em cada poço da placa utilizando uma micropipeta automática, e ao final deste procedimento, incubou-se por 30 minutos a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Enquanto as microplacas encontravam-se incubadas, o anticorpo primário monoclonal específico para cada sorotipo do vírus da dengue foi diluído na solução de tampão de saturação (1:5000). Após o término dos 30 minutos a solução foi removida, e distribuiu-se 50 μL da diluição do anticorpo primário, conforme apresentado no Apêndice B, em cada poço e incubado por mais 45 minutos a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Após essa segunda incubação, foi preparada a solução do anticorpo secundário, na qual o mesmo foi diluído na solução de tampão de saturação já previamente preparada (1:1000), e mantida sob agitação magnética para homogeneização.

A solução do anticorpo primário foi removida dos poços por inversão, e as placas foram lavadas duas vezes em um recipiente contendo a solução de lavagem e retirado o excesso através de papel absorvente. Após esse processo, foi distribuída a solução de anticorpo secundário em cada poço e incubado por 45 minutos a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Concomitante a essa incubação, foi preparado substrato da fosfatase alcalina, ao abrigo de luz, 30 minutos antes e sob agitação magnética conforme apresentado no Apêndice B.

Removeu-se a diluição dos anticorpos secundários dos poços por inversão e as placas foram lavadas duas vezes em um recipiente contendo a solução de lavagem e retirado o excesso em papel absorvente. Foram distribuídos 50 μL do substrato em cada poço e incubou-se em temperatura ambiente ao abrigo de luz por 60 a 90 minutos.

Assim que foram observadas manchas escuras e claramente visíveis nos poços, a reação foi parada, removeu-se o substrato dos poços por inversão e as placas foram lavadas duas vezes em um recipiente contendo água destilada, sendo retirado todo o excesso em papel absorvente, e mantidas à temperatura ambiente por no mínimo 30 minutos para secagem.

4.8 Leitura da placa e cálculo do título infeccioso

Após o período de secagem, as culturas de células inoculadas foram observadas a olho nu e/ ou ao microscópio invertido quanto à presença ou ausência de efeito citopático em cada um dos poços. A determinação da DICC_{50} foi feita em cada microplaca, na qual foram contados os números de poços positivos, através da presença do vírus, identificados pela coloração para cada uma das oito diluições. Os poços que exibiram efeito citopático foram considerados positivos, e então preenchidos na planilha e, os que não apresentaram coloração, ausência de efeito citopático, foram considerados como negativos. Os poços foram observados ao microscópio caso houvesse alguma dúvida quanto ao efeito citopático.

Os títulos virais foram calculados com auxílio do programa CombiStats® v5.0 pelo método Spearman & Karber e expressos em DICC_{50} por dose humana.

4.9 Critérios do ensaio

O ensaio foi embasado através dos seguintes critérios:

- Observação de pelo menos 80% das diluições negativas do vírus (poços negativos) com monocamada intacta, para todas as placas por amostra e sorotipo;
- Controle de células sem coloração específica;
- Em todas as placas observar pelo menos 80% do controle de células com monocamada bem definida;

4.10 Construção do gráfico controle pelo software SPC Explorer RT (*Statistical Process Control*)

A construção dos gráficos de controle foi realizada utilizando o programa SPC Explorer RT, versão 5.21 (Quality América Inc.). O acompanhamento do processo de controle de qualidade da vacina da dengue foi realizado a partir da análise de quatro gráficos (um para cada sorotipo) a partir dos valores de potência obtidos nos ensaios realizados no INCQS/Fiocruz.

Os valores finais encontrados por ambos os analistas para cada um dos sorotipos no CombiStats® v5.0, apresentados nas tabelas do item 5.1 foram então inseridos no SPC, que por fim determinou a faixa dos limites permissíveis, que serão utilizados nos ensaios posteriores para o cálculo de potência da vacina da dengue. Estas faixas foram estabelecidas com base na leitura realizada em cada placa, sendo duas placas para cada sorotipo

Os eixos dos gráficos foram formados pelo número dos ensaios (abscissa) e pelo resultado do teste de potência (ordenada). As linhas horizontais do gráfico consistiram da média e dos limites de alerta e de controle superiores e inferiores, calculados a partir da média adicionada de três desvios-padrão (DP).

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de potência

De acordo com a leitura das microplacas, obtivemos os seguintes resultados para cada uma das diluições apresentadas nas tabelas abaixo:

Tabela 2 - Leitura de poços infectados por placa em diferentes diluições – Analista 1.

Sorotipo 1 – Analista 1								
Dil.	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3		Ensaio 4	
	1	2	1	2	1	2	1	2
-2,6	10	10	10	10	10	10	10	10
-3,2	10	10	10	10	10	10	10	10
-3,8	10	10	10	10	10	10	10	10
-4,4	5	4	10	6	6	6	8	10
-5,0	2	1	2	2	2	5	4	5
-5,6	0	1	3	0	3	2	2	0
-6,2	1	0	0	0	1	0	0	0
-6,8	0	0	0	0	0	1	1	0

Fonte: (Do autor, 2018).

Tabela 3 - Leitura de poços infectados por placa em diferentes diluições – Analista 2.

Sorotipo 1 – Analista 2								
Dil.	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3		Ensaio 4	
	1	2	1	2	1	2	1	2
-2,6	10	10	10	10	10	10	10	10
-3,2	10	10	10	10	10	10	10	10
-3,8	9	10	10	10	9	10	10	10
-4,4	3	4	8	8	8	5	10	9
-5,0	2	0	3	2	3	3	3	6
-5,6	2	0	0	0	0	1	2	1
-6,2	0	0	0	0	0	0	0	0
-6,8	0	0	1	0	0	0	0	0

Fonte: (Do autor, 2018).

Tabela 4 - Leitura de poços infectados por placa em diferentes diluições – Analista 1.

Sorotipo 2 – Analista 1		
Dil.	Ensaio 1	
	1	2
-2,6	10	10
-3,2	10	10
-3,8	9	10
-4,4	6	5
-5,0	0	1
-5,6	0	0
-6,2	0	0
-6,8	0	0

Fonte: (Do autor, 2018).

Tabela 5 - Leitura de poços infectados por placa em diferentes diluições – Analista 2.

Sorotipo 2 – Analista 2		
Dil.	Ensaio 1	
	1	2
-2,6	10	9
-3,2	10	9
-3,8	8	8
-4,4	4	2
-5,0	1	3
-5,6	0	0
-6,2	0	0
-6,8	0	0

Fonte: (Do autor, 2018).

Tabela 6 - Leitura de poços infectados por placa em diferentes diluições – Analista 1.

Sorotipo 3 – Analista 1								
Dil.	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3		Ensaio 4	
	1	2	1	2	1	2	1	2
-2,6	10	10	10	10	10	10	10	10
-3,2	9	10	8	10	9	8	10	10
-3,8	4	10	7	6	5	4	3	4
-4,4	1	1	3	2	2	3	2	1
-5,0	2	2	1	1	0	1	0	0
-5,6	0	0	0	0	0	0	0	0
-6,2	0	0	0	0	0	0	0	0
-6,8	0	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: (Do autor, 2018).

Tabela 7 - Leitura de poços infectados por placa em diferentes diluições – Analista 2.

Sorotipo 3 – Analista 2								
Dil.	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3		Ensaio 4	
	1	2	1	2	1	2	1	2
-2,6	10	10	10	10	10	10	10	10
-3,2	10	10	9	10	10	10	10	10
-3,8	6	6	3	8	6	8	7	7
-4,4	3	2	2	1	1	2	1	1
-5,0	1	2	0	1	0	1	1	0
-5,6	0	0	0	0	0	1	0	0
-6,2	0	0	0	0	0	0	0	0
-6,8	0	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: (Do autor, 2018).

Tabela 8 - Leitura de poços infectados por placa em diferentes diluições – Analista 1.

Sorotipo 4 – Analista 1								
Dil.	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3		Ensaio 4	
	1	2	1	2	1	2	1	2
-2,6	10	9	10	10	10	10	10	10
-3,2	8	9	10	10	9	10	9	10
-3,8	8	6	7	2	5	6	6	5
-4,4	4	3	2	2	1	3	1	1
-5,0	1	0	0	1	1	1	0	0
-5,6	0	1	0	0	0	0	0	0
-6,2	0	0	0	0	0	0	0	1
-6,8	0	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: (Do autor, 2018).

Tabela 9 - Leitura de poços infectados por placa em diferentes diluições – Analista 2.

Sorotipo 4 – Analista 2								
Dil.	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3		Ensaio 4	
	1	2	1	2	1	2	1	2
-2,6	10	10	10	10	10	10	10	10
-3,2	9	10	10	10	10	10	10	8
-3,8	7	5	7	4	5	4	5	5
-4,4	1	1	1	1	1	1	2	0
-5,0	1	2	0	1	0	0	1	0
-5,6	1	0	0	0	0	0	0	0
-6,2	0	1	0	0	0	0	0	0
-6,8	0	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: (Do autor, 2018).

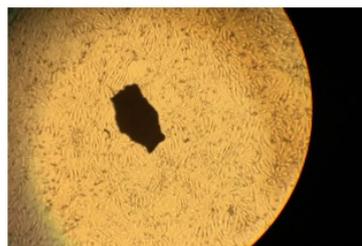
Pelas leituras obtidas, pode-se observar que o efeito citopático foi decrescente frente às diluições crescentes para todos os tipos de vírus titulados, tanto para o Analista 1 quanto para o Analista 2. Além disso, todas as monocamadas de células do controle negativo mantiveram-se bem definidas e inalteradas após o período de incubação das microplacas (dados não mostrados).

Os resultados encontrados para cada uma das diluições mostradas nas tabelas acima correspondem ao número de poços positivos para o efeito citopático celular, que varia de zero (nenhum efeito observado) a dez (efeito observado em todos os poços). Podemos observar o efeito citopático celular conforme a ilustração na Figura 9.

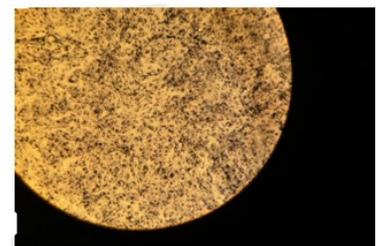
Figura 9 - Comparação entre células não infectadas com células infectadas pelo vírus da dengue por microscopia óptica com aumento de 40x.



Célula não infectada



Célula não infectada com apenas um ponto de tingimento



Célula infectada

Fonte: (Do autor, 2018).

5.2 Cálculo das potências

O CombiStats® v5.0 é um *software* estatístico comumente utilizado para a análise estatística de dados de ensaios de diluição biológica ou ensaios de potência.

Com base nas leituras realizadas, obtivemos os seguintes valores calculados pelo CombiStats® v5.0 apresentados nas tabelas a seguir:

Tabela 10 - Cálculo final no *CombiStats* por analista e sorotipo.

Data	Tipo	Analista	Valor (\log_{10})
13/03/2018	1	Analista1	5,27
			5,15
03/04/2018	1	Analista 2	5,15
			5,03
27/08/2018	1	Analista 1	5,71
			5,27
27/08/2018	1	Analista 2	5,52
			5,40
28/08/2018	1	Analista 1	5,52
			5,65
28/08/2018	1	Analista 2	5,40
			5,34
05/09/2018	1	Analista 1	5,71
			5,71
05/09/2018	1	Analista 2	5,71
			5,77

Fonte: (Do autor, 2018).

Tabela 11 - Cálculo final no *CombiStats* por analista e sorotipo.

Data	Tipo	Analista	Valor (\log_{10})
13/03/2018	2	Analista1	1 5,09
			2 5,15
03/04/2018	2	Analista 2	1 4,96
			2 4,84

Fonte: (Do autor, 2018).

Tabela 12 - Cálculo final no *CombiStats* por analista e sorotipo.

Data	Tipo	Analista	Valor (\log_{10})
14/03/2018	3	Analista1	4,52
			4,96
04/04/2018	3	Analista 2	4,77
			4,77
10/09/2018	3	Analista 1	4,70
			4,70
10/09/2018	3	Analista 2	4,39
			4,77
11/09/2018	3	Analista 1	4,52
			4,52
11/09/2018	3	Analista 2	4,58
			4,90
13/09/2018	3	Analista 1	4,45
			4,45
13/09/2018	3	Analista 2	4,71
			4,64

Fonte: (Do autor, 2018).

Tabela 13 - Cálculo final no *CombiStats* por analista e sorotipo.

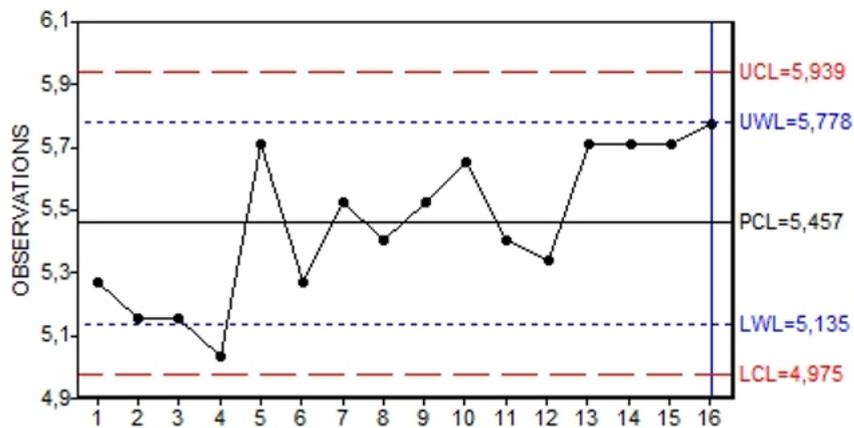
Data	Tipo	Analista	Valor (\log_{10})
14/03/2018	4	Analista1	4,84
			4,65
04/04/2018	4	Analista 2	4,71
			4,71
10/09/2018	4	Analista 1	4,71
			4,45
10/09/2018	4	Analista 2	4,64
			4,52
11/09/2018	4	Analista 1	4,52
			4,77
11/09/2018	4	Analista 2	4,52
			4,45
13/09/2018	4	Analista 1	4,52
			4,58
13/09/2018	4	Analista 2	4,65
			4,32

Fonte: (Do autor, 2018).

5.3 Controle sistemático do lote através do gráfico controle

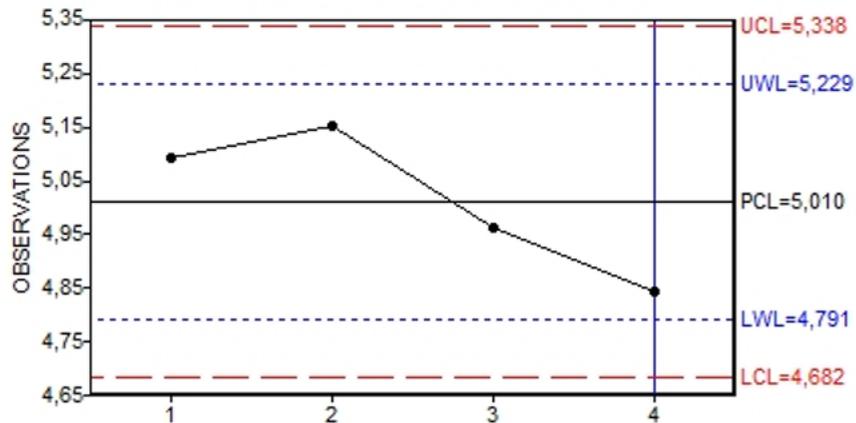
Os resultados foram plotados no gráfico controle para realizar o controle sistemático do lote, na qual as médias, os DP e os limites foram calculados em cima dos 16 primeiros títulos mensurados para os sorotipos 1, 3 e 4 nas *figuras* 10, 12 e 13, e para os quatro primeiros títulos referentes ao sorotipo 2 na figura 11.

Figura 10 - Gráfico Controle dos ensaios do sorotipo 1.



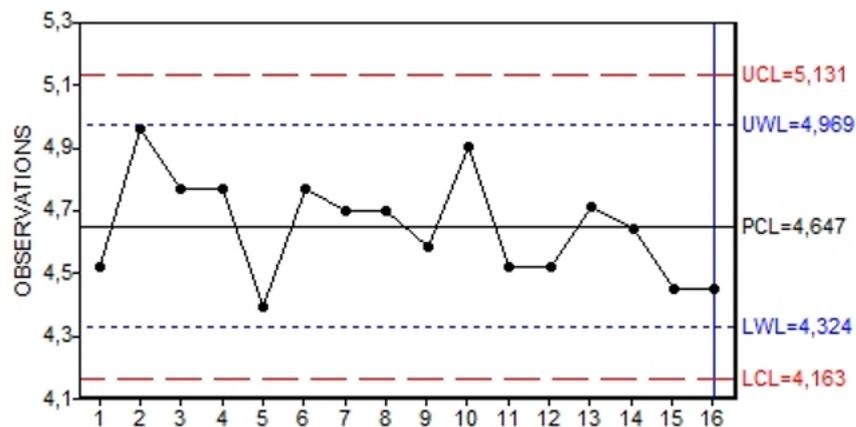
Fonte: (Gerado pelo *software* SPC).

Figura 11 - Gráfico Controle dos ensaios do sorotipo 2.



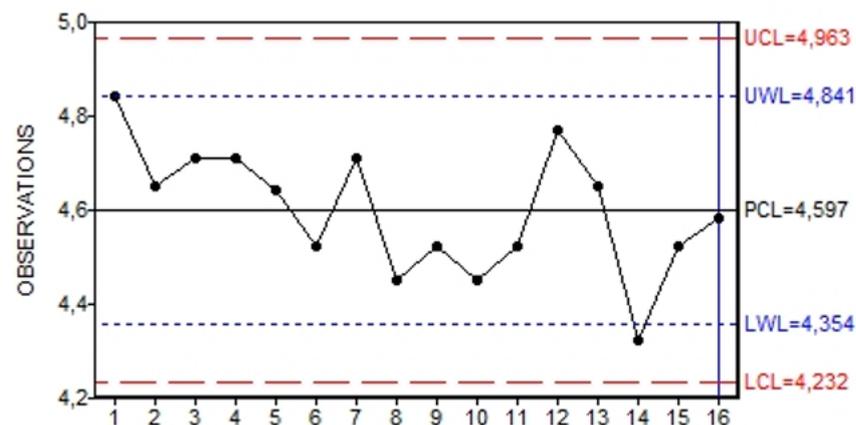
Fonte: (Gerado pelo software SPC).

Figura 12 - Gráfico Controle dos ensaios do sorotipo 3.



Fonte: (Gerado pelo software SPC).

Figura 13 - Gráfico Controle dos ensaios do sorotipo 4.



Fonte: (Gerado pelo software SPC).

--- LSA (UWL): Limite Superior de Alerta; --- LIA (LWL): Limite Inferior de Alerta; __ LSC (UCL): Limite Superior de Controle; __ LIC (LCL): Limite Inferior de Controle; _____ média (PCL).

5.4 Controle sistemático do lote através do gráfico controle

Após os cálculos de potência realizados pelo CombiStats® v5.0 de cada um dos analistas, foram delineadas no SPC as faixas limites específicas para cada um dos sorotipos conforme a *Tabela 14*.

Tabela 14 - Limites estabelecidos pelo SPC Explorer RT.

Sorotipos	PCL (média)	LCL - UCL	LWL - UWL
1	5,457	4,975 – 5,939	5,135 – 5,778
2	5,010	4,682 – 5,338	4,791 – 5,229
3	4,647	4,163 – 5,131	4,324 – 4,969
4	4,597	4,232 – 4,963	4,354 – 4,841

Fonte: (Do autor, 2018).

*LSA (UWL): Limite Superior de Alerta; LIA (LWL): Limite Inferior de Alerta; LSC (UCL): Limite Superior de Controle; LIC (LCL): Limite Inferior de Controle; média (PCL).

6 DISCUSSÃO

O uso de gráficos de controle visa acompanhar, avaliar, controlar e aperfeiçoar o desempenho de processos ao longo de um período estipulado. Esta ferramenta é comumente utilizada para determinar uma faixa de limites estabilizados (base para a interpretação do controle estatístico), especificando os limites superior, inferior e de alarme, na qual os gráficos construídos de acordo com a potência calculada, não poderão ultrapassar, além de estabelecer critérios para a distinção entre as causas comuns e especiais de variabilidade (INCQS, 2016).

Os gráficos, que são amplamente utilizados para monitorar a média e a variabilidade de variáveis, foram preparados pelo software SPC a partir dos dados coletados (MONTGOMERY, 2004).

O presente estudo possui a finalidade de elaborar uma carta controle da vacina de referência para utilização nos ensaios futuros de potência da vacina da dengue.

As vacinas de uso humano são medicamentos profiláticos com a capacidade de induzir a imunidade específica no indivíduo vacinado frente a um agente infeccioso. Com a institucionalização do PNI, estes imunobiológicos passaram a sofrer um rígido controle de qualidade no Brasil por determinação do Ministério da Saúde com objetivo principal de estimular e expandir a utilização de agentes imunizantes, tanto de origem nacional quanto internacional, buscando a integridade e a uniformidade das ações relativas às imunizações realizadas no país (NETTO, 2010).

A vacina da dengue fabricada pelo laboratório Sanofi Pasteur (Dengvaxia®) é uma vacina que já está sendo comercializada pelo mercado privado, porém ainda está em análise para a sua entrada no PNI. Contudo, o INCQS em parceria com o laboratório francês, através de uma transferência de metodologia, analisou a potência da vacina frente aos quatro sorotipos, elaborando em conjunto uma carta controle.

A metodologia do ensaio de potência para a construção da carta controle, se deu através da avaliação da atividade biológica da vacina produzida pelo laboratório fabricante, em que a titulação dos quatro sorotipos virais foram realizadas através do uso de culturas de células da linhagem VERO, em um ensaio *in vitro*. As células utilizadas para a infecção, titulação e obtenção da potência possuem maior susceptibilidade específicas para os antígenos virais dos sorotipos 1, 2, 3 e 4, uma vez que as mesmas já haviam sido testadas anteriormente pelo laboratório fabricante.

De acordo com as análises realizadas, a principal característica que evidenciou a presença do vírus nas células foi à formação do efeito citopático e alteração morfológica celular. Tais resultados são condizentes com o resultado esperado descrito na metodologia preconizada para o ensaio, na qual o maior número de poços infectados (positivos) estariam localizados nas menores diluições (mais concentradas).

Conforme os valores calculados e a apresentação dos gráficos, os testes de desempenho verificaram a existência de um valor além dos limites de alarme no gráfico referente ao sorotipo 1 e 4 (Figura 10 e 13). Estes valores não influenciaram diretamente a sensibilidade e robustez do ensaio para estes sorotipos, uma vez que não houve valores ascendentes ou descendentes ao limite de controle.

Para os sorotipos 2 e 3 não foram observados nenhum valor excedente aos limites de controle permitidos, configurando em conjunto aos outros sorotipos um desempenho satisfatório aos ensaios.

O número de ensaios realizados para os quatro sorotipos influencia diretamente no cálculo dos limites do gráfico controle, uma vez que fora estipulado um valor de 20 resultados para que o cálculo da faixa limite se tornasse constante, ou seja, após o cálculo apresentado com os 20 primeiros valores, o limite calculado se tornará fixo independente dos valores dos ensaios que irão surgir subsequentemente. Embora o valor mínimo de 20 ensaios tenha sido estipulado conforme a metodologia aplicada, isso não inviabiliza os ensaios realizados no INCQS/Fiocruz com apenas 16 ensaios para os sorotipos 1, 3 e 4, e apenas quatro ensaios para o sorotipo 2, visto que os intervalos, ou seja, as faixas dos limites serão criadas conforme novos valores de novos ensaios forem sendo realizados.

No ensaio para o sorotipo 2 pode-se observar que foram realizados apenas quatro ensaios (*Tabela 8*), o que não inviabilizou a aprovação do teste, já que foi possível efetuar as leituras, e que a amostra se mostrou positiva apresentando efeitos citopáticos decrescente frente às diluições crescentes. Devido ao pequeno número de anticorpos cedidos pelo laboratório fabricante, os ensaios para este sorotipo foram reduzidos quando comparados aos demais sorotipos, apresentando então um número de resultados inferior aos outros. Contudo, novos ensaios serão realizados e novos resultados serão incluídos, garantindo mais robustez e sensibilidade à construção do gráfico controle.

Os ensaios realizados com os quatro sorotipos não apresentaram nenhum valor acima ou abaixo dos limites permissíveis, o que demonstrou satisfatórios os resultados calculados.

Neste contexto, novos ensaios serão realizados de forma a complementar esse estudo contribuindo para o desfecho da análise do gráfico controle da vacina de referência da dengue (Dengvaxia®).

7 CONCLUSÃO

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

- O ensaio de potência utilizando a linhagem VERO revelou-se satisfatório quanto aos efeitos citopáticos apresentados, mostrando-se decrescentes frente às diluições crescentes para todos os sorotipos titulados.
- De acordo com os ensaios realizados por ambos analistas, a vacina de referência apresentou valores de potência satisfatórios e em conformidade com as especificações de acordo com o fabricante.
- Os ensaios realizados com os quatro sorotipos não apresentaram nenhum valor acima ou abaixo dos limites permissíveis.
- Todos os ensaios foram considerados válidos e satisfatórios, pois cumpriram com os critérios de validação do ensaio e se mantiveram dentro dos limites estabelecidos.

8 PERSPECTIVAS

O ensaio demonstrou ser reprodutível pela abordagem prática adotada, no entanto, ensaios complementares devem ser realizados para atingir o $n = 20$ e dar continuidade a este trabalho.

REFERÊNCIAS

ACHEE, Nicole L. *et al.* A critical assessment of vector control for dengue prevention. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 5, p. e0003655, 2015.

ALVES, Emanuele Amorim; GUIMARÃES, Anna Christina Rosa. Cultivo celular. *In*: MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis (org.). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. p. 215-253. v. 2.

ANVISA. **Vacina dengue**: esclarecimentos. 2015. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/web/guest/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/vacina-dengue-esclarecimentos/219201. Acesso em: 12 abr. 2018.

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.

BARRETO, Mauricio L.; TEIXEIRA, Maria G. L. C. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estud. av.**, v.22, n.64, 2008.

BHAMARAPRAVATI, N.; SUTEE, Yoksan. Live attenuated tetravalent dengue vaccine. **Vaccine**, v. 18, p. 44-47, 2000.

BHATT, Samir et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Dengue**: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. Brasília: FUNASA, 2002. 20 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos, nº 176).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º.73 de 21 de outubro de 2008. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para procedimento de liberação de lotes de vacinas e soros hiperimunes heterólogos para consumo no Brasil e também para exportação. **Diário Oficial da União**, 16 abr. 1999. Disponível em: www.anvisa.gov.br/legis Acesso em: 1 ago. 2018

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º.17 de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, 22 out 2008. Disponível em: www.anvisa.gov.br/legis. Acesso em: 1 set. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Departamento De Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico adulto e criança**. Brasília, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. **Saúde Brasil 2012: uma análise da situação de saúde e dos 40 anos do Programa Nacional de Imunizações**. Brasília, 2013.

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, Ricardo. **Controle estatístico do processo de produção da suspensão viral da vacina contra a febre amarela fabrica por Bio Manguinhos/FIOCRUZ**. 2005. 82 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, em parceria com o Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

DANS, A. L. *et al.* Controversy and debate on dengue vaccine series-paper 1: review of a licensed dengue vaccine: inappropriate subgroup analyses and selective reporting may cause harm in mass vaccination programs. **Journal of clinical epidemiology**, v. 95, p. 137-139, 2018.

DE OLIVEIRA, Camila C. *et al.* **Manual para elaboração de cartas de controle para monitoramento de processos de medição quantitativos em laboratórios de ensaio**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2013.

DOMINGUES, Carla M. A. S.; TEIXEIRA, Antônia Maria da Silva. Coberturas vacinais e doenças imunopreveníveis no Brasil no período 1982-2012: avanços e desafios do Programa Nacional de Imunizações. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 22, n. 1, p. 9-27, 2013.

FARMACOPEIA Brasileira. 5 ed. Brasília, DF: ANVISA/FIOCRUZ, 2010. p.59-70. v.1.

FRESHNEY, R. Ian. Basic principles of cell culture. **Culture of cells for tissue engineering**, p. 11-14, 2006.

GAILHARDOU, Sophia *et al.* Safety overview of a recombinant live-attenuated tetravalent dengue vaccine: pooled analysis of data from 18 clinical trials. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 7, p. e0004821, 2016.

GUBLER, Duane J. Epidemic dengue and dengue hemorrhagic fever: a global public health problem in the 21st century. *In*: SCHELD, W.M.; ARMSTRONG, D.; HUGHES, J.M. (ed.). **Emerging infections 1**. Washington: American Society of Microbiology, 1998. p. 1-14.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.1020.002**: gráfico de controle (média/amplitude). Rev 01. Rio de Janeiro, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3430.031**: manutenção de cultivos celulares aderentes. Rev 08. Rio de Janeiro, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **PU 3430.057**: manutenção e fornecimento da linhagem celular vero para ensaio de potência e termoestabilidade da vacina contra dengue. Rev 01. Rio de Janeiro, 2018. 9 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

MASSAD, Eduardo *et al.* Dengue and the risk of urban yellow fever reintroduction in Sao Paulo State, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, p. 477-484, 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.

MONTGOMERY, D. C. **Introdução ao controle estatístico da qualidade**. Brasil: Livros Técnicos e Científicos, 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.

PONTE, Carlos *et al.* Vacinação, controle de qualidade e produção de vacinas no Brasil. **Hist. cienc. saude-Manguinhos**, v. 10, supl. 2, p.619-653, 2003.

ROCHA, Tiago Galdino; GALENDE, Sharize B.. A importância do Controle de Qualidade na Indústria Farmacêutica. **Revista Uningá Review**, v. 20, n. 2, 2018.

SABCHAREON, Arune *et al.* Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. **The Lancet**, v. 380, n. 9853, p. 1559-1567, 2012.

SANOFI PASTEUR. Vacina Dengvaxia®. **Bula de vacina**. [S.d.]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/index.asp. Acesso em: 05 maio 2018

SANOFI PASTEUR. Vacina Dengvaxia®. **POP Q_0144050**: Titrage infectieux et idenification du vaccin dengue CYD SUR cellules VERO em microplaques par DICCC50 – batiment CQ (A300) neuville. Rev 17. Paris, 2018.

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.

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.

SILVA, Luiz Jacintho da; RICHTMANN, Rosana. Vaccines under development: group B streptococcus, herpes-zoster, HIV, malaria and dengue. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 3, p. s115-s124, 2006.

TEIXEIRA, Maria da Glória; BARRETO, Maurício L.; GUERRA, Zouraide. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 4, p. 5-33, 1999.

TEMPORÃO, José G.; NASCIMENTO, Márcia V. L.; MAIA, Maria de Lourdes de Sousa. Programa Nacional de Imunizações (PNI): história, avaliação e perspectivas. *In: Vacinas, soros & imunizações no Brasil*. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2005. p. 101-123.

VANNICE, Kirsten S.; ROEHRIG, John T.; HOMBACH, Joachim. Next generation dengue vaccines: a review of the preclinical development pipeline. **Vaccine**, v. 33, n. 50, p. 7091-7099, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE *et al.* Dengue vaccine: WHO position paper, July 2016—recommendations. **Vaccine**, v. 35, n. 9, p. 1200-1201, 2017a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global strategy for dengue prevention and control 2012–2020**. Geneva: World Health Organization, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global Vaccine Safety. **GACVS Statement on Dengvaxia® (CYD-TDV)**. 2017b. Disponível em: https://www.who.int/vaccine_safety/committee/GACVS-StatementonDengvaxia-CYD-TDV/en/. Acesso em: 07 maio 2018

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. Geneva: World Health Organization, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Report of the Scientific Working Group meeting on Dengue**. Geneva: World Health Organization, 2006

APÊNDICE A – MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES (continua)

Formulação do MEM 5% SFB utilizado para manutenção da linhagem celular VERO			
<u>Suplementos</u>	<u>Fabricante</u>	<u>Função</u>	<u>Quantidade</u>
MEM (10X)	Life Technologies	Meio de Cultura Específico para a célula	100mL
SFB	Hyclone Fisher Scientific	Suplementar o meio de cultura enriquecendo-o com nutrientes essenciais	50mL
Bicarbonato de sódio 5,6%	Eurobio	Ajuste de pH da solução	33mL
L-Glutamina 200mM	Life Technologies	Aminoácido essencial	10mL
Penicilina 105U/ML + Dihidroestreptomicina 2,5% p/v	Eurobio	Antibióticos	2mL
Água purificada estéril	Otec	-	q.s.p 1000mL

Formulação do MEM 10% SFB utilizado para manutenção da linhagem celular VERO			
<u>Suplementos</u>	<u>Fabricante</u>	<u>Função</u>	<u>Quantidade</u>
MEM (10X)	Life Technologies	Meio de Cultura Específico para a célula	100mL
SFB	Hyclone Fisher Scientific	Suplementar o meio de cultura enriquecendo-o com nutrientes essenciais	100mL
Bicarbonato de sódio 5,6%	Eurobio	Ajuste de pH da solução	33mL
L-Glutamina 200mM	Life Technologies	Aminoácido essencial	10mL
Penicilina 105U/ML + Dihidroestreptomicina 2,5% p/v	Eurobio	Antibióticos	2mL
Água purificada estéril	Otec	-	q.s.p 1000mL

Formulação do MEM 10% SFB utilizado para fornecimento da linhagem celular VERO			
<u>Suplementos</u>	<u>Fabricante</u>	<u>Função</u>	<u>Quantidade</u>
MEM (10X)	Life Technologies	Meio de Cultura Específico para a célula	100mL
Soro Fetal Bovino (SFB)	Hyclone Fisher Scientific	Suplementar o meio de cultura enriquecendo-o com nutrientes essenciais	100mL
Bicarbonato de sódio 5,6%	Eurobio	Ajuste de pH da solução	33mL
L-Glutamina 200mM	Life Technologies	Aminoácido essencial	10mL
Penicilina 105U/ML + Dihidroestreptomicina 2,5% p/v	Eurobio	Antibióticos	2mL
HEPES	Life Technologies	Agente tamponante	20mL
Água purificada estéril	Otec	-	q.s.p 1000mL

APÊNDICE A – MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES (conclusão)

Formulação da Solução de PBS (1X) sem Ca²⁺ e sem Mg²⁺			
<u>Suplementos</u>	<u>Fabricante</u>	<u>Função</u>	<u>Quantidade</u>
PBS (10X) estéril	Eurobio	Solução tampão, que tem como finalidade manter um valor de pH praticamente constante, quando adicionados a diferentes meios. O PBS é uma solução isotônica (tem a mesma pressão osmótica) e não é tóxico em relação às células. Ele pode também ser utilizado para diluir diferentes substâncias, ou como uma solução para limpeza celular	100mL
Água purificada estéril	Otec	-	q.s.p 1000mL

Formulação da Solução de Tripsina Versene EDTA			
<u>Suplementos</u>	<u>Fabricante</u>	<u>Função</u>	<u>Quantidade</u>
PBS (10X) estéril	Eurobio	Solução tampão, que tem como finalidade manter um valor de pH praticamente constante, quando adicionados a diferentes meios. O PBS é uma solução isotônica (tem a mesma pressão osmótica) e não é tóxico em relação às células. Ele pode também ser utilizado para diluir diferentes substâncias, ou como uma solução para limpeza celular.	100mL
Tripsina Versene EDTA	Thermo Fisher Scientific	Enzima proteolítica que hidrolisa as cadeias polipeptídicas formando terminações de clivagens. Essa reação desestrutura a matriz, impossibilitando a ligação dos receptores de superfície celular, obrigando as células a rearranjarem seu citoesqueleto.	100mL
Água purificada estéril	Otec	-	q.s.p 1000mL

APÊNDICE B – PREPARO DAS SOLUÇÕES (continua)

Fixação com acetona 85%			
<u>Suplementos</u>	<u>Fabricante</u>	<u>Função</u>	<u>Quantidade</u>
Acetona	Carlo Erba	Fixação da camada celular na microplaca	1700mL
Água Destilada	Otec	-	q.s.p 2000mL

Tampão de Lavagem (armazenado por 1 mês a temperatura ambiente)			
<u>Suplementos</u>	<u>Fabricante</u>	<u>Função</u>	<u>Quantidade</u>
PBS (10x) sem Ca ⁺² e Mg ⁺²	Eurobio	Solução tampão, que tem como finalidade manter um valor de pH praticamente constante, quando adicionados a diferentes meios. O PBS é uma solução isotônica (tem a mesma pressão osmótica) e não é tóxico em relação às células. Ele pode também ser utilizado para diluir diferentes substâncias, ou como uma solução para limpeza celular	100mL
Tween 20	Merck	Tensoativo Hidrofílico, solubilizador e agente de limpeza	0,5mL
Água Destilada	Otec	-	q.s.p 1000mL

Tampão de Saturação (preparado imediatamente antes do uso)			
<u>Suplementos</u>	<u>Fabricante</u>	<u>Função</u>	<u>Quantidade</u>
Skimmilk	Difco	-	2,5g
Triton X-100 MW 647	Sigma	Surfactante não iônico	0,5mL
Tampão de Lavagem	-	-	100mL

Diluição do Anticorpo Primário			
<u>Suplementos</u>	<u>Fabricante</u>	<u>Função</u>	<u>Quantidade</u>
Anticorpo	Sanofi Pasteur	Se ligar aos epítomos dos antígenos específicos para cada tipo de vírus da Dengue	De acordo com o ensaio
Tampão de Saturação	-	-	De acordo com o ensaio

Diluição do Anticorpo Secundário			
<u>Suplementos</u>	<u>Fabricante</u>	<u>Função</u>	<u>Quantidade</u>
Anticorpo	Sanofi Pasteur	Se ligar ao anticorpo primário	De acordo com o ensaio
Tampão de Saturação	-	-	De acordo com o ensaio

APÊNDICE B – PREPARO DAS SOLUÇÕES (conclusão)

Solução de Levamisol (armazenado por 2 meses a 2-8°C)			
<u>Suplementos</u>	<u>Fabricante</u>	<u>Função</u>	<u>Quantidade</u>
Tetramisol hidrocloreto (levamisol)	Sigma	Antifúngico que permite a manutenção das placas a longo prazo	0,96g
Água destilada	Otec	-	10mL

Substrato Fosfatase Alcalina			
<u>Suplementos</u>	<u>Fabricante</u>	<u>Função</u>	<u>Quantidade</u>
BCIP/NBT	Sigma	-	1tablete
Água destilada	Otec	-	10mL
Solução de Levamisol	-	-	0,1mL