

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

Thaís de Cássia de Souza Su

**ELEIÇÃO DE LOTE DE REFERÊNCIA DE TRABALHO ESPECÍFICA DE
PRODUTO PARA AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE VACINA ADSORVIDA
CONTRA HEPATITE B**

Rio de Janeiro

2019

Thaís de Cássia de Souza Su

ELEIÇÃO DE LOTE DE REFERÊNCIA DE TRABALHO ESPECÍFICA DE PRODUTO
PARA AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE VACINA ADSORVIDA CONTRA HEPATITE B

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.

Tutor: Marcelo Luiz Lima Brandão

Preceptora: Renata Faria de Carvalho

Rio de Janeiro

2019

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Su, Thaís

Eleição de lote de referência de trabalho para avaliação da potência da vacina adsorvida hepatite B. / Thaís Su. - 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, 2019.

Tutor: Marcelo Luiz Lima Brandão.

Preceptora: Renata Faria de Carvalho.

1. Hepatite B. 2. Vacina Adsorvida Hepatite B. 3. Ensaio de Potência. 4. Controle de Qualidade. 5. Vigilância Sanitária. I. Título.

Election of work reference lot for assessment of potency of adsorbed hepatitis B vaccine.

Thaís de Cássia de Souza Su

ELEIÇÃO DE LOTE DE REFERÊNCIA DE TRABALHO ESPECÍFICA DE PRODUTO
PARA AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE VACINA ADSORVIDA CONTRA HEPATITE B

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

Renata Faria de carvalho (Mestre) - Preceptora

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / FIOCRUZ

Elizabeth Porto Reis Lucas (Mestre) / FIOCRUZ

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Wlamir Corrêa de Moura (Doutor) / FIOCRUZ

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Fausto Klabund Ferraris (Doutor) – Suplente

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / FIOCRUZ

Dedico este trabalho à minha mãe (*in memoriam*),

Rita de Cássia.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pelas ótimas oportunidades de aprendizado tanto para o meu crescimento profissional quanto pessoal e, principalmente, por colocar pessoas maravilhosas na minha vida, desde os amigos que fiz ao longo desses anos até os profissionais com quem tive o prazer de trabalhar e construir uma amizade.

À minha mãe (*in memoriam*), Rita de Cássia, por ser o meu maior exemplo de perseverança, dedicação, resiliência e amor mais genuíno. Agradeço por ter me ensinado todos os valores que tenho e sempre ter prezado pelo meu bem estar e aprendizado.

À minha tia, Valéria Lage, pelo carinho, incentivo e apoio.

À minha irmã, Márcia Danielle, e aos meus primos, Marcella, Bruno e Paula, pelas conversas e companhia.

Ao meu namorado, Gustavo Chiarelli, pelo amor, compreensão e por me incentivar e auxiliar em todos os momentos desde que o conheci.

Aos amigos que fiz durante estes dois anos, em especial a Jessica, Gabriella, Raphaela, Yasmin, Inah e Felipe, por todas as conversas, almoços, conselhos, risadas e amizade, vocês tornaram meus dias mais leves e divertidos.

À Renata Carvalho e Simone Bastos, por toda a amizade, paciência e generosidade em compartilhar conhecimentos. Vocês são incríveis e não tenho palavras para descrever como eu sou grata por ter tido o privilégio de trabalhar nesse laboratório. Sem dúvidas, vocês são exemplos que eu pretendo seguir.

À Renata Medeiros, Magno Maciel e Tiago Savignon, por terem me recebido tão bem no laboratório de Fisiologia e por me ajudarem a amadurecer muito durante esse um ano de convívio.

Ao Marcelo Brandão por suas sugestões e orientação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, pela residência multiprofissional em Vigilância Sanitária, que me permitiu aprender tanto nesse período.

A todos do INCQS com quem tive contato por esses dois anos tão agradáveis e enriquecedores.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

RESUMO

A hepatite B é uma doença infectocontagiosa causada por um vírus do gênero *Orthohepadnavirus* pertencentes a família Hepadnaviridae. O ser humano é o único reservatório do vírus da hepatite B (VHB) e sua transmissão pode ocorrer pelas vias parenteral, sexual ou vertical. O paciente pode apresentar a forma assintomática, aguda, fulminante ou crônica, sendo suas principais complicações, o desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular. A Organização Mundial da Saúde calcula que, em 2015, 257 milhões de pessoas no mundo estavam infectadas pelo vírus. O vírus é composto por um ácido desoxirribonucleico (DNA) de fita dupla envelopado e apresenta três antígenos importantes: o antígeno de superfície s (HBsAg), do capsídeo (HBcAg) e o antígeno e (HBeAg). A vacinação é a medida mais efetiva para a profilaxia da doença. No Brasil, as vacinas contra hepatite B utilizadas atualmente são disponibilizadas gratuitamente pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI) e produzidas por meio da tecnologia de DNA recombinante para expressão do HBsAg em leveduras, cujas espécies e metodologias envolvidas variam de acordo com o produtor. O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz) é responsável pelo controle da qualidade das vacinas utilizadas no PNI, realizando, dentre outros ensaios, a avaliação da potência das vacinas contra a hepatite B. O ensaio de potência é realizado *in vitro*, utilizando um teste imunoenzimático (ELISA) para a quantificação do HBsAg presente na vacina. Para a realização deste ensaio, utiliza-se uma vacina de Referência de Trabalho, testada em paralelo às vacinas em análise, para cada produtor, conforme especificado pela Farmacopeia Brasileira. O presente estudo teve como objetivo a eleição de um lote candidato a vacina de Referência de Trabalho Específica para o Produto. Para isto, após análise documental foi selecionado um lote candidato, o qual foi submetido a repetidos ensaios de potência realizados por dois analistas distintos, em dias diferentes, cujos resultados foram submetidos a critérios de aceitação de ensaio baseados em análises estatísticas (desvios de linearidade e paralelismo) e cujas absorvâncias de cada diluição foram utilizadas para elaboração de um gráfico de controle, estabelecendo limites máximo e mínimo aceitos. Todos os ensaios foram considerados satisfatórios, não apresentando desvios de linearidade e paralelismo, e potências estimadas superiores a 75% do valor rotulado pelo produtor. As absorvâncias de cada diluição

se mantiveram dentro dos limites estabelecidos pelo gráfico de controle. Portanto, o lote candidato à vacina de Referência de Trabalho atendeu aos requisitos necessários para se tornar o novo lote de vacina de Referência de Trabalho.

Palavras-chave: Hepatite B. Vacina Adsorvida Hepatite B. Ensaio de Potência. Controle de Qualidade. Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

Hepatitis B is an infectious disease with caused by a virus of the genus Orthohepadnavirus belonging to the family Hepadnaviridae. The humans are the only reservoirs of the hepatitis B virus (HBV) and this disease can be transmitted by parenteral, sexual or vertical routes. The patient may present an asymptomatic, acute, fulminant or chronic form, and its main complications are the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The World Health Organization estimates that by 2015, 257 million people were infected worldwide with the virus. The virus is composed of an enveloped deoxyribonucleic acid (DNA) and has three important antigens: the surface antigen (HBsAg), the capsid (HBcAg) and the antigen e (HBeAg). Vaccination is the most effective way for prophylaxis of the disease. In Brazil, hepatitis B vaccines, are currently available provided by the National Immunization Program (PNI) and produced using recombinant DNA technology for the expression of HBsAg in yeast, whose species and methodologies vary according to the producer. The National Institute of Quality Control in Health of the Oswaldo Cruz Foundation (INCQS / Fiocruz) is responsible for the quality control of the vaccines supplied by PNI, conducting, among other tests, an evaluation of the potency of vaccines against hepatitis B. The test is performed in vitro using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the quantification of HBsAg present in the vaccine. For its execution, use a Working Reference vaccine, tested in parallel to the vaccines under analysis, for each producer, based on the Brazilian Pharmacopoeia requirements. The present study aimed at the election of a candidate batch of Working Product Specific Reference vaccine. For this, after the preliminary documentary analysis one batch was selected, which was subjected to a matrix of potency tests runs by two different analysts, on different days, from the results obtained, the absorption of each dilution were used for the elaboration of a control chart, setting accepted maximum and minimum limits. All the tests were considered satisfactory, presenting no linearity and/or parallelism deviations, and estimated potencies were higher than 75% of the producer labeled value by. The absorbances of each dilution were kept within the limits established by the control chart. Therefore, the candidate lot of the Labor Reference Vaccine met the requirements necessary to become the new Working Reference Vaccine lot.

Keywords: Hepatitis B. Hepatitis B Adsorbed Vaccine. Potency testing. Quality control. Health Surveillance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura esquemática da partícula viral completa (Partícula de Dane)..	166
Figura 2 - Modelo esquemático da partícula viral completa da Hepatite B (Partícula de Dane) e das partículas subvirais filamentosa e esférica.	16
Figura 3 - Síndromes clínicas apresentadas pelos pacientes com hepatite B.	188
Figura 4 - Prevalência da infecção por VHB na população mundial de acordo com a região geográfica, no ano de 2015.....	199
Figura 5 - Taxa de detecção de casos de hepatite B no Brasil, segundo região de residência, nos anos de 2003 a 2017.....	20
Figura 6 - Linha do tempo com os principais eventos referentes à vacina contra hepatite B no PNI, de 1973 a 2000.	24
Figura 7 - Representação esquemática do ensaio ELISA tipo sanduíche.....	288
Figura 8 - Esquema das pré-diluições e diluições para realização do ELISA.	33
Figura 9 - Distribuição das triplicatas das diluições e dos controles positivo e negativo na microplaca.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados dos cinco ensaios com seus respectivos analistas, datas de realização dos ensaios, potências estimadas do lote A (candidato à vacina de referência de trabalho) e limites de confiança mínimo e máximo.....	36
Tabela 2 - Limites máximos e mínimos e médias dos gráficos controle para as diluições de 0,25ng/mL; 0,50ng/mL; 1,00ng/mL e 1,50ng/mL.....	37

LISTA DE SIGLAS

ALT – Alanino aminotransferase
Anti-HBc – Anticorpos contra o HBcAg
Anti-HBs – Anticorpos contra o HBsAg
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA – Albumina sérica bovina
CAE – Critérios de aceitação de ensaios
Cenadi - Central Nacional de Armazenamento e Distribuição de Insumos
DI – Departamento de Imunologia
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DO – Densidade óptica ou absorbância
ELISA – Ensaio imunoenzimático
HBcAg – Antígeno do capsídeo do VHB
HBeAg – Antígeno e do VHB
HBsAg – Antígeno de superfície s do VHB
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
INCQS/Fiocruz – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz
LVVCC – Laboratório de Vacinas Virais, Biofármacos e Cultura de Células
MS – Ministério da Saúde
mUI/mL – Miliunidades Internacionais por mililitro
nm – Nanômetro
µg – Micrograma
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – Solução tampão fosfato-salino
POP – Procedimento Operacional Padrão
PNI – Programa Nacional de Imunizações
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
RNA – Ácido ribonucleico
SNVE – Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica
VHB – Vírus da Hepatite B

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Hepatite B	15
1.2 Agente etiológico da hepatite B	15
1.3 Patogenia	17
1.4 Epidemiologia	19
1.5 Vacinas contra hepatite B	20
1.6 PROGRAMA NACIONAL de IMUNIZAÇÕES – PNI	233
1.7 Controle da qualidade das vacinas adquiridas pelo PNI	25
1.8 Avaliação da potência da vacina adsorvida contra hepatite B	26
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Amostras de vacinas	31
4.1.1 Lote candidato à vacina de referência de trabalho – Lote A.....	31
4.1.2 Vacina de referência de trabalho atual – lote B.....	31
4.2 Determinação da potência das vacinas contra Hepatite B	32
4.2.1 Condições gerais para a realização do ensaio.....	32
4.2.2 Diluições das amostras de vacinas	32
4.2.3 Metodologia do Kit Comercial Murex HBsAg.....	33
4.3 Leitura e avaliação estatística dos resultados	34
4.4 Critérios de Aceitação do Ensaio (CAE)	35
4.5 Garantia da qualidade dos resultados	35
5 RESULTADOS	36
5.1 Determinação da potência das vacinas contra Hepatite B	36
5.2 Gráfico controle para eleição do lote de referência de trabalho	36
6 DISCUSSÃO	38
7 CONCLUSÃO	41
8 PERSPECTIVAS	42
REFERÊNCIAS	43

ANEXO A – CALENDÁRIO NACIONAL DE VACINAÇÃO / ANO 2018..... Erro!

Indicador não definido.

ANEXO B – RECOMENDAÇÕES DO MINISTÉRIO DA SAÚDE PARA VACINAÇÃO CONTRA HEPATITE B EM GRUPOS ESPECIAIS488

ANEXO C – 1º ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE LOTE CANDIDATO À VACINA DE REFERÊNCIA DE TRABALHO – ANALISTA 149

ANEXO D – 2º ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE LOTE CANDIDATO À VACINA DE REFERÊNCIA DE TRABALHO – ANALISTA 150

ANEXO E – 3º ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE LOTE CANDIDATO À VACINA DE REFERÊNCIA DE TRABALHO– ANALISTA 251

ANEXO F – 4º ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE LOTE CANDIDATO À VACINA DE REFERÊNCIA DE TRABALHO – ANALISTA 252

ANEXO G – 5º ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE LOTE CANDIDATO À VACINA DE REFERÊNCIA DE TRABALHO – ANALISTA 153

ANEXO H – GRÁFICO CONTROLE PARA DILUIÇÃO DE 0,25 ng/mL DA AMOSTRA DO LOTE A.....54

ANEXO I – GRÁFICO CONTROLE PARA DILUIÇÃO DE 0,50 ng/mL DA AMOSTRA DO LOTE A..... Erro! Indicador não definido.

ANEXO J – GRÁFICO CONTROLE PARA DILUIÇÃO DE 1,00 ng/mL DA AMOSTRA DO LOTE A.....56

ANEXO K – GRÁFICO CONTROLE PARA DILUIÇÃO DE 1,50 ng/mL DA AMOSTRA DO LOTE A.....57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hepatite B

A hepatite B é uma doença infectocontagiosa de grande importância para a saúde pública. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), está amplamente distribuída nos continentes, totalizando 257 milhões de pessoas infectadas em 2015. É uma das principais causas de cirrose e carcinoma hepatocelular no mundo e, em 2016, foi considerada a segunda causa de óbitos entre as hepatites virais no Brasil (BRASIL, 2018a; OMS, 2017a; FREITAS et al., 2016).

1.2 Agente etiológico da Hepatite B

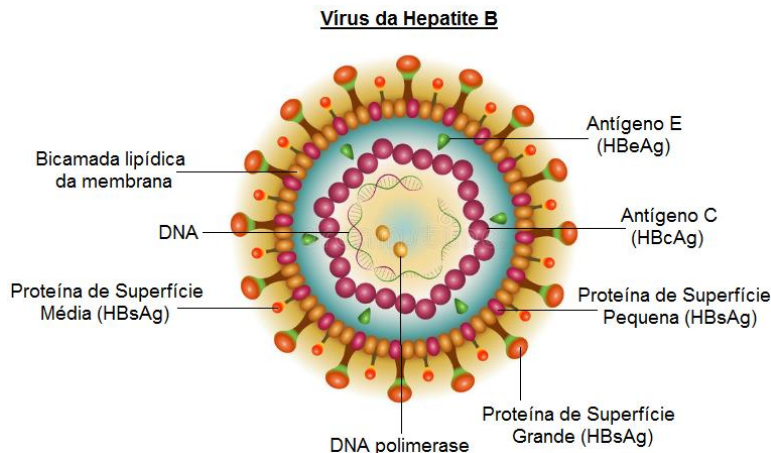
A doença é causada pelo vírus da hepatite B (VHB) que possui tropismo primário pelo tecido hepático, alta taxa de replicação, é oncogênico e altamente infeccioso – dez vezes mais infeccioso que o vírus da imunodeficiência humana (HIV) –, além de ser capaz de se manter viável fora do corpo humano por até uma semana. Existem vacinas seguras e eficazes contra o VHB, e são oferecidas gratuitamente pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Ministério da Saúde do Brasil (MS) (PARANÁ et al., 2009; BRASIL, 2008).

O VHB pertence ao gênero *Orthohepadnavirus* da família Hepadnaviridae. Possui ácido desoxirribonucleico (DNA) circular parcialmente duplicado, contendo 3.020 a 3.320 nucleotídeos. Pode causar hepatite aguda, fulminante - também conhecida como forma aguda grave - ou crônica, cirrose hepática e contribuir para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (RONCATO, BALLARDIN, LUNGE, 2008; FONSECA, 2007; SCHAEFER, 2007).

A partícula viral completa capaz de infectar as células, também conhecida como partícula de Dane, possui formato esférico com, aproximadamente, 42 nm, e três antígenos importantes: o antígeno de superfície s (HBsAg), do capsídeo (HBcAg) e o antígeno e (HBeAg), conforme ilustrado na figura 1. É um vírus envelopado, cujo envelope lipoproteico contém as três formas (pequena, média e grande) do HBsAg. Também apresenta um nucleocapsídeo proteico com antígenos c, do capsídeo ou core (HBcAg) de, aproximadamente, 27 nm. No interior deste nucleocapsídeo, além da molécula de DNA, também se encontra a enzima RNA

polimerase dependente de DNA com atividade de transcriptase reversa (BRASIL, 2017b; LEE; AHN, 2011).

Figura 1 - Estrutura esquemática da partícula viral completa (Partícula de Dane).

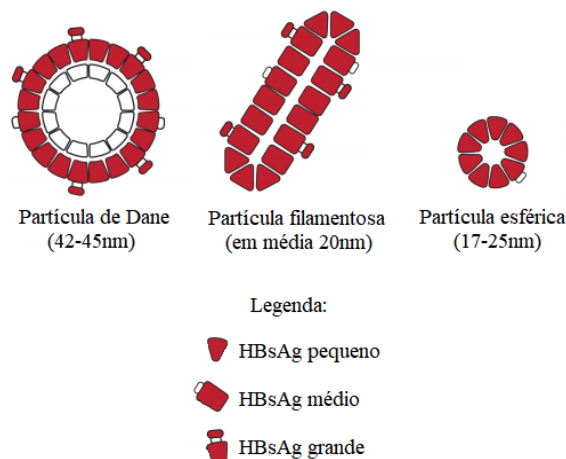


Fonte: (Site Dreamstime. Disponível em: <https://www.dreamstime.com/stock-images-hepatitis-b-virus-particle-structure-file-eps-format-image36579194>. Acesso em: 26 jun. 2018).

Durante a replicação viral nos hepatócitos, são produzidas partículas subvirais não infecciosas compostas do HBsAg e, em menor quantidade, do HBeAg (RONCATO, BALLARDIN, LUNGE, 2008; FONSECA, 2007).

As partículas subvirais não infecciosas são compostas apenas por HBsAg, podendo adquirir formato filamentosos ou esférico, de acordo com o tamanho das partículas de HBsAg que a compuserem (LEE; AHN, 2011). Na figura 2, estão ilustradas as estruturas dos três tipos de partículas de VHB.

Figura 2 - Modelo esquemático da partícula viral completa da Hepatite B (Partícula de Dane) e das partículas subvirais filamentosas e esféricas.



Fonte: (LEE; AHN, 2011).

1.3 Patogenia

São considerados suscetíveis à doença, os indivíduos negativos para HBsAg, anticorpos contra HBcAg (anti-HBc) e anticorpos contra HBsAg (anti-HBs) concomitantemente. Uma vez estabelecida a imunidade adquirida naturalmente, o indivíduo apresentará anti-HBc e anti-HBs reagentes e, com o tempo, os níveis de anti-HBs podem se tornar indetectáveis. A vacina contra o VHB induz apenas à formação de anti-HBs (BRASIL, 2017a).

A transmissão do agente pode ocorrer pelas vias vertical (sendo o principal momento de contaminação, o parto), sexual, por meio de ferimentos cutâneos, compartilhamento de seringas e agulhas, transfusão de sangue ou hemoderivados ou em acidentes com material biológico (OMS, 2016b; BRASIL, 2006).

O vírus infecta, primariamente, os hepatócitos. Posteriormente, as partículas virais podem ser encontradas também em linfócitos B e T, baço, coração, pâncreas, medula óssea e rins. O período de transmissibilidade do vírus começa de duas a três semanas antes dos primeiros sintomas e persiste enquanto o HBsAg estiver detectável, sendo que pacientes com HBeAg reagente apresentam maior risco de transmissão quando comparados aos pacientes com HBeAg não reagente (BRASIL, 2017a; PARANÁ et al., 2009; FONSECA, 2007; LOCARNINI, 2003).

Após o indivíduo suscetível entrar em contato com o vírus, o tempo de incubação varia de 45 a 160 dias. Dependendo da interação entre o VHB e o hospedeiro, pode ocorrer a forma assintomática da doença ou o desenvolvimento da hepatite fulminante ou aguda durante os primeiros seis meses. Após esse período, a doença pode progredir para a forma crônica ou para a resolução da doença (BRASIL, 2017a; FONSECA, 2007; FATTOVICH, 2003).

As síndromes clínicas e suas respectivas características causadas pelo VHB estão apresentadas na figura 3.

Figura 3 - Síndromes clínicas apresentadas pelos pacientes com hepatite B.

Hepatite Aguda	<ul style="list-style-type: none"> - Durante os primeiros seis meses; - O paciente apresentará náuseas, adinamia, fadiga, anorexia, vômitos, diarreia, febre baixa, elevação dos níveis de ALT (alanino aminotransferase), hepatomegalia dolorosa. Na maioria dos pacientes (cerca de 70%), o curso da doença se mantém subclínico ou anictérico, entretanto, paradoxalmente, os 30% que desenvolveram a forma icterícia na fase aguda da doença têm menos chances de evoluir para a forma crônica, podendo se recuperar totalmente (BHAMIDIMARRI, MARTIN, 2015; BRASIL, 2017b).
Hepatite Fulminante	<ul style="list-style-type: none"> - Durante as primeiras oito semanas; - O paciente apresenta icterícia grave, náusea severa, coagulopatia e encefalopatia hepática, podendo evoluir para coma e morte rapidamente (BHAMIDIMARRI, MARTIN, 2015; BRASIL, 2017b).
Hepatite Crônica	<ul style="list-style-type: none"> - Persistência do vírus por mais de seis meses; - Geralmente é assintomática ou oligossintomática, mas também pode se apresentar como sintomática, com sinais histológicos de lesão hepática (inflamação, com ou sem fibrose) e marcadores sorológicos ou virológicos de replicação viral (DA FONSECA, 2007; BHAMIDIMARRI, MARTIN, 2015; BRASIL, 2017b).

Fonte: (Do autor, 2018).

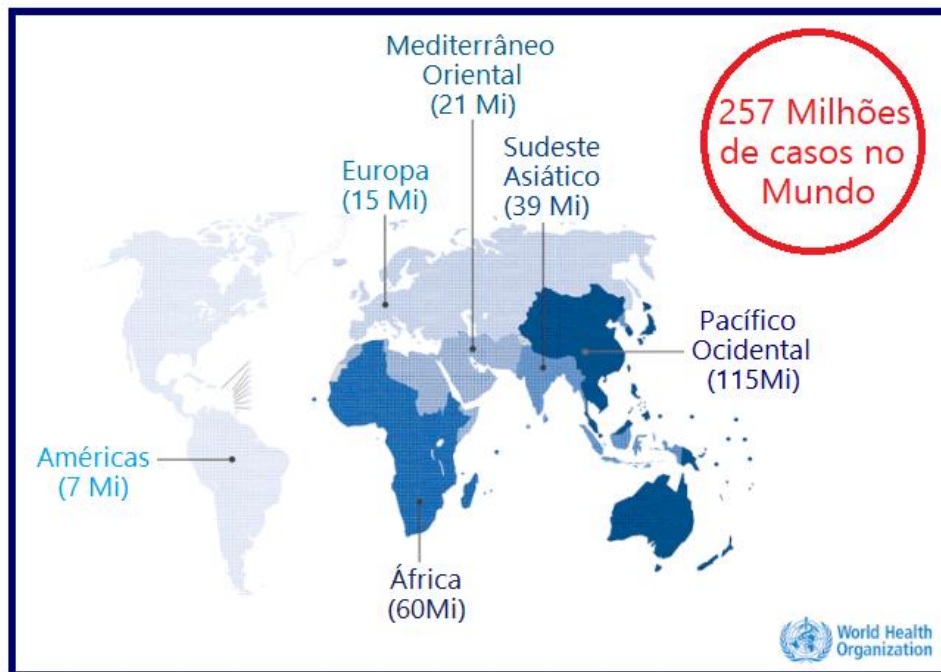
Além das formas clínicas supracitadas, podem ocorrer algumas complicações decorrentes da hepatite B, sendo as de maior importância: a cirrose hepática e o carcinoma hepatocelular. A doença pode evoluir diretamente para o hepatocarcinoma sem a necessidade da ocorrência de cirrose previamente, ao contrário da hepatite C (BRASIL, 2017a; PARANÁ et al., 2009; BRASIL, 2008).

O tratamento para a hepatite B aguda se baseia no alívio dos sintomas (OMS, 2017d). Por sua vez, o tratamento da hepatite B crônica consiste no uso de antivirais a fim de evitar a progressão da doença hepática, suprimindo a replicação viral e a atividade necroinflamatória hepática, desta forma, minimizando as complicações, os casos de cirrose, carcinoma hepatocelular e óbito (BRASIL, 2017d).

1.4 Epidemiologia

A região com maior prevalência, totalizando 115 milhões de pessoas afetadas, se encontra no oeste do Pacífico – compreendendo, dentre outros países, China, Japão, Coreias do Norte e do Sul, Nova Zelândia, Austrália, Malásia e Vietnã – e o continente americano, com sete milhões de pessoas afetadas, corresponde à região com menor prevalência, conforme mostra a figura 4 (OMS, 2017a).

Figura 4 - Prevalência da infecção por VHB na população mundial de acordo com a região geográfica, no ano de 2015.



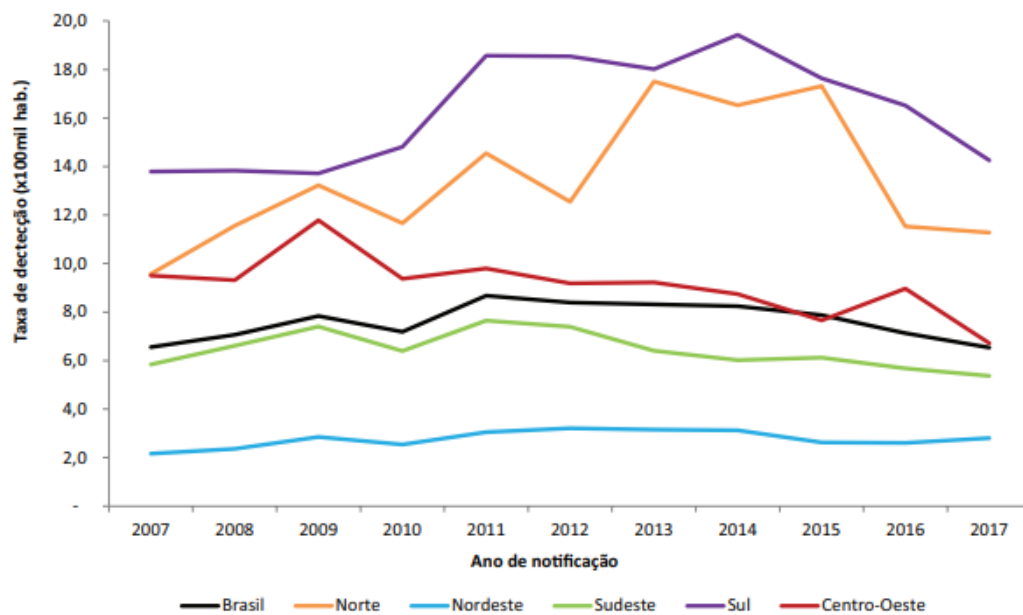
Fonte: (OMS, 2017b).

Em áreas de alta endemicidade, como no sudeste asiático, na maioria das regiões da África, e ilhas do Pacífico e Ártico, a infecção perinatal e a horizontal no início da infância são as principais vias de transmissão do VHB. Já nas regiões de baixa endemicidade, como no ocidente, a doença afeta principalmente adolescentes e adultos, que se contaminam pelas vias sexual e parenteral, com o uso de drogas injetáveis (BHAMIDIMARRI, MARTIN, 2015; FATTOVICH, 2003).

As regiões brasileiras com maiores taxas de detecção de casos de Hepatite B são: Sul e Norte, cujos valores em 2017 foram superiores à média nacional, enquanto que o Sudeste e o Nordeste apresentaram valores inferiores à média, e a

região Centro-Oeste apresentou valores próximos à média, conforme mostra a figura 5 (BRASIL, 2018a).

Figura 5 - Taxa de detecção de casos de hepatite B no Brasil, segundo região de residência, nos anos de 2003 a 2017.



Fonte: (BRASIL, 2018a).

1.5 Vacinas contra Hepatite B

A medida mais eficaz e com melhor custo benefício para a prevenção primária e controle da hepatite B é a vacinação. Em 2015, 179 países já haviam introduzido a vacina contra o VHB em seus programas de imunização, obtendo resultados efetivos, com redução acentuada nas taxas de portadores, nas complicações decorrentes da infecção pelo VHB e na incidência de câncer de fígado. As vacinas contra o VHB atualmente disponíveis são extremamente seguras e têm uma eficácia superior a 90%. (MEIRELES; MARINHO; VAN DAMME, 2015).

Em 1981, foi registrada e licenciada a primeira vacina contra o VHB, ela continha HBsAg purificado obtido do plasma de pessoas com infecção crônica pelo vírus. Estudos randomizados mostraram que tal vacina era bem tolerada e eficaz, protegendo os vacinados contra o VHB em 95% dos casos. Entretanto, por ser derivada do plasma, havia algumas preocupações quanto ao potencial de transmissão de outras infecções sanguíneas (MEIRELES; MARINHO; DAMME, 2015).

Em 1988, a vacina produzida a partir de plasma foi substituída pela constituída por HBsAg recombinante. Esta vacina foi a primeira a ser produzida utilizando técnica de biologia molecular, por meio da clonagem do gene *s* do VHB em células de levedura, e foi a primeira com um alvo triplo: evitando o carcinoma hepatocelular, e prevenindo infecções pelos vírus das hepatites B e D (agente causador da hepatite D, dependente do VHB para se replicar e agravando a hepatite B pré existente) (MEIRELES; MARINHO; DAMME, 2015; DANTAS, 2010; BRASIL, 2008).

A vacina adsorvida contra Hepatite B contém o HBsAg purificado e como adjuvante o hidróxido de alumínio. Alguns produtores utilizam o timerosal como conservante. O HBsAg presente na vacina é obtido exclusivamente por engenharia genética, utilizando-se leveduras de diferentes espécies, de acordo com o produtor (BRASIL, 2006).

A resposta vacinal é medida de um a três meses após a última dose da vacina, pela titulação de anti-HBs que deve apresentar níveis superiores a 10 mUI/mL. A maioria das pessoas que recebem as três doses de vacinas contra o VHB atualmente disponíveis produz uma resposta anti-HBs protetora e duradoura, ainda que ocorra uma diminuição nos anticorpos anti-HBs ao longo do tempo (MEIRELES; MARINHO; DAMME, 2015). Devido à alta eficácia da vacina, o teste sorológico pós-vacinal para titular anticorpos protetores não é rotineiramente indicado, exceto para pessoas que pertençam a grupos de risco (BRASIL, 2006).

Como a hepatite B possui um longo período de incubação, que excede os poucos dias necessários para a reativação de células de memória específicas do HBsAg, ainda que não haja anticorpos circulantes suficientes no momento da infecção, ocorrerá a ativação das células de memória induzidas pela vacina durante a replicação viral, permitindo a interrupção da replicação antes do início da doença crônica. Como os estágios iniciais da infecção permanecem assintomáticos, os indivíduos imunocompetentes vacinados não necessitam de doses de reforço da vacina para permanecerem imunes (LAMBERT; LIU; SIEGRIST, 2005). Consequentemente, o Ministério da Saúde, habitualmente, não recomenda a aplicação de doses de reforço da vacina em indivíduos imunocompetentes (BRASIL, 2006).

Contudo, cerca de 5 a 10% dos adultos saudáveis não produzem níveis protetores de anti-HBs e podem ser considerados não respondedores. Vários

fatores, como condições inadequadas de armazenamento da vacina, administração que não segue as recomendações, idade, índice de massa corporal, alcoolismo crônico, cirrose, insuficiência renal crônica, imunossupressão, receptores de transplante de órgãos, hemodiálise crônica, diabetes do tipo I, doença celíaca, tabagismo, predisposição genética, abuso de drogas ou infecções no momento da vacinação, podem ser associados a essa menor taxa de resposta (MEIRELES; MARINHO; DAMME, 2015). A maioria dos indivíduos não responsivos à série de três doses primárias com concentrações de anticorpos anti-HBs ≥ 10 mUI/mL respondem a uma série de vacinação adicional de três doses (OMS, 2017d).

Há apresentações pediátricas e para adultos da vacina contra VHB, em diferentes concentrações, cujas doses a serem administradas variam de acordo com o produto, a idade e a condição do receptor, visto que indivíduos com condições que predisponham à baixa resposta imunológica podem necessitar do dobro da dose recomendada para a sua respectiva idade. A administração deve ser por via intramuscular, salvo em alguns casos. As vacinas devem ser mantidas sob temperaturas entre 2°C e 8 °C, e não podem ser congeladas (BRASIL, 2006).

As formulações disponíveis são monovalentes e multivalentes – que oferece proteção contra o VHB e outras doenças, como: difteria, poliomielite, tétano, coqueluche, hepatite A e infecções causadas por *Haemophilus influenzae* tipo B. A imunogenicidade das vacinas mono e multivalentes são semelhantes. Conforme mostra o calendário nacional de vacinação do PNI apresentado no Anexo A, ao nascimento – recém-nascidos com menos de 24 horas de vida –, utiliza-se apenas a vacina monovalente para a imunização contra o VHB, a fim de evitar a transmissão intrafamiliar precoce - que é de cerca de 95% -, posteriormente, utiliza-se a formulação multivalente (BRASIL, 2018b; MEIRELES; MARINHO; DAMME, 2015).

As vacinas multivalentes são preferencialmente utilizadas em programas de imunização infantil, uma vez que minimizam o custo e facilitam a adesão, pois reduzem a dor, o desconforto emocional para a criança e para os pais e a relutância em administrar injeções múltiplas, por conseguinte, evitam que a vacinação seja adiada ou perdida, aumentando o risco da criança contrair a doença (LAMBERT; LIU; SIEGRIST, 2005; SEWELL; JACOBSON; WENIGER, 2001).

A vacina combinada pentavalente (DTP/HB/Hib) protege contra difteria, tétano, pertussis, hepatite B e *Haemophilus influenzae* tipo B, e as três doses são disponibilizadas gratuitamente pelo PNI para crianças a partir dos dois meses de

idade, com intervalos de 30 dias entre as doses, completando a imunização aos seis meses de idade (BRASIL, 2018b; MEIRELES; MARINHO; DAMME, 2015).

Portanto, para indivíduos em geral, o esquema de imunização contra hepatite B adotado pelo Ministério da Saúde consiste em quatro doses: a primeira, monovalente, preferencialmente nas primeiras 12 horas após o nascimento; e as demais doses, de vacina pentavalente, aos dois, quatro e seis meses. Para grupos de risco, o esquema de vacinação e dose da vacina a ser aplicada podem variar, podendo necessitar de sorologia pós vacinação, conforme apresentado no Anexo B (BRASIL, 2006).

O ser humano é o único reservatório do VHB, portanto, uma estratégia de controle abrangente poderia eventualmente levar à erradicação do vírus. Sabendo-se disso e dos impactos econômicos, sociais e na saúde pública, a OMS planejou metas para a agenda 2020-2030 a fim de eliminar as hepatites virais. Para alcançar tais metas, foram propostas estratégias que devem ser adaptadas às prioridades e legislações de cada país, englobando a vacinação contra hepatite B; a prevenção da transmissão vertical; o controle da qualidade de bolsas de sangue; o melhor acesso ao diagnóstico e tratamento; e a vigilância mais ativa das hepatites. O Brasil reconheceu a importância e necessidade dessa estratégia e se comprometeu a participar deste plano (OMS, 2017c; OMS, 2016a; MEIRELES; MARINHO; DAMME, 2015).

O principal empecilho para uma cobertura vacinal completa contra hepatite B no mundo é o alto custo. Entretanto, atualmente, devido a economias de escala, produção local de vacinas, competição entre produtores, envolvimento de doadores e descontos obtidos pela OMS para compras por atacado para países em desenvolvimento, o preço dessas vacinas tem diminuído significativamente, chegando a custar em 2001, 10% do valor que custava em 1990, a dose da vacina monovalente (MEIRELES; MARINHO; DAMME, 2015).

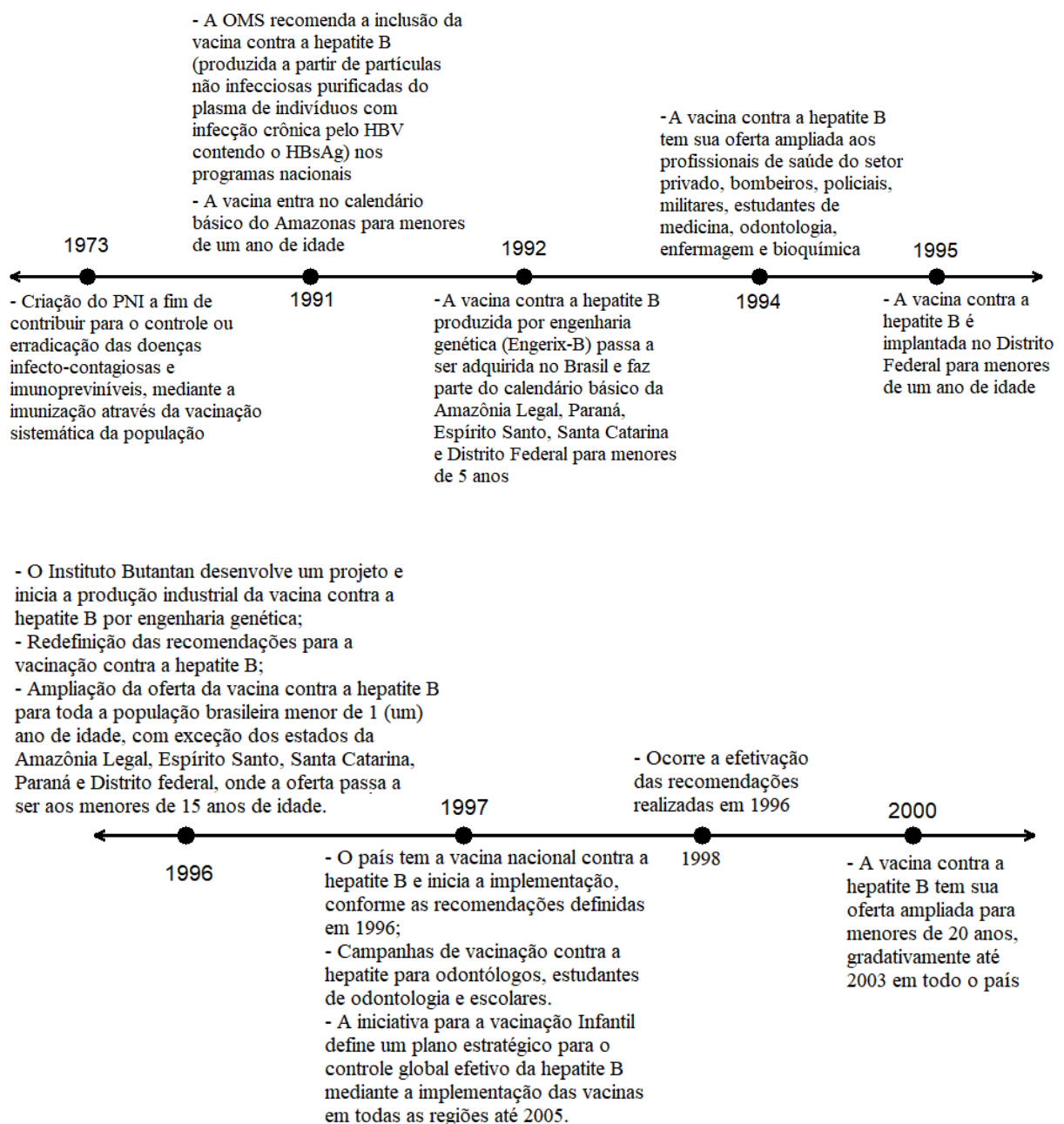
1.6 Programa Nacional de Imunizações – PNI

Desde o início do século XIX, as vacinas já vêm sendo utilizadas no Brasil como medidas para o controle de doenças. Em 1904 ocorreu a primeira campanha de vacinação no Brasil para controlar a varíola. Em 1973 foi formulado o PNI, regulamentado pela Lei Federal no 6.259, de 30 de outubro de 1975, e pelo Decreto

nº 78.321, de 12 de agosto de 1976, que instituiu o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica (SNVE) (BRASIL, 2003; BRASIL, 1976; BRASIL, 1975).

A figura 6 apresenta a linha do tempo com os principais eventos referentes à vacina contra hepatite B no PNI, entre os anos de 1973, com a criação do programa, e 2000, com a oferta da vacina contra VHB ampliada para menores de 20 anos em todo o país (BRASIL, 2013; BRASIL, 2012).

Figura 6 - Linha do tempo com os principais eventos referentes à vacina contra hepatite B no PNI, de 1973 a 2000.



Fonte: (Do autor, 2018).

O PNI faz parte de um programa internacional de cooperação entre países para o fortalecimento da vacinação (Programa Ampliado de Imunizações), devendo se ajustar às diretrizes técnicas determinadas pela Organização Pan-Americana de Saúde (BRASIL, 2017e; TEMPORÃO, 2003).

Os produtos adquiridos pelo MS são enviados à Central Nacional de Armazenagem e Distribuição (Cenadi), em São Paulo, atualmente. Posteriormente, amostras de todos os lotes de imunobiológicos são coletadas e enviadas ao INCQS para análise documental e/ou laboratorial antes da distribuição para o consumo. Se após as análises, o produto for considerado aprovado, o CENADI distribuirá as vacinas para a instância estadual, que enviará para a instância regional e, por fim, a vacina chegará às instâncias municipais e locais (BRASIL, 2017c; BRASIL, 2017e).

Os imunobiológicos distribuídos pelo PNI devem ser mantidos numa rede de frio – durante o armazenamento, conservação, manipulação, distribuição e transporte –, a fim de garantir que esses produtos mantenham suas características iniciais, conferindo imunidade. Para garantir a cadeia de frio, as temperaturas máxima e mínima em todas as instâncias (nacional - Cenadi, estadual, municipal e local) devem ser verificadas pelo menos três vezes ao dia: no início de cada jornada de trabalho (manhã e tarde) e ao final da última jornada de trabalho (tarde). Algumas vacinas admitem o congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, como a vacina contra o sarampo, por exemplo, entretanto, independente da instância, a vacina contra hepatite B deve ser sempre mantida refrigerada entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (BRASIL, 2017e).

Caso ocorra alguma falha nesta rede, seja por manuseio inadequado, congelamento, equipamento defeituoso ou falta de energia elétrica, a ocorrência deve ser obrigatoriamente comunicada às instâncias superiores, que comunicarão à Coordenação-Geral do PNI. O lote exposto a essa situação de desvio de qualidade deve ser segregado, identificado e mantido sob temperaturas entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, enquanto o PNI e o INCQS avaliarão as ocorrências (BRASIL, 2017e).

1.7 Controle da qualidade das vacinas adquiridas pelo PNI

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n.º 73/2008 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (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 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, 2017c; BRASIL, 2008b).

As vacinas do PNI a serem analisadas são encaminhadas ao INCQS/Fiocruz e submetidas a análises documental e/ou laboratorial antes da liberação dos lotes. A análise documental consiste na análise do protocolo resumido da produção e controle da qualidade das diversas etapas de produção, lote final e matérias primas. As análises laboratoriais são realizadas para avaliar a eficácia – estabilidade, identidade, potência – e segurança – esterilidade, toxicidade e pirogênio ou endotoxina bacteriana (BRASIL, 2010; NETTO, 2010).

1.8 Avaliação da potência da vacina adsorvida contra HEPATITE B

Inicialmente, os ensaios de potência para controle de qualidade das vacinas contra hepatite B eram realizados *in vivo*, avaliando a imunogenicidade do produto em camundongos. Entretanto, este método apresentava alta variabilidade e custo, sendo mais demorado e necessitando de grande número de animais, que eram submetidos a estresse e sofrimento devido aos ensaios laboratoriais (MARTÍNEZ et al, 2005; KARIMZADEH et al., 2010).

Devido às desvantagens supracitadas relacionadas ao uso de animais em ensaios e ao surgimento do conceito dos 3Rs, a reavaliação da utilização de animais nos experimentos passou a ser tendência mundial (SCHECHTMAN, 2002; MEYER, 2003).

O conceito dos 3Rs é assim denominado em função das iniciais de seus principais objetivos, em inglês: 1) redução (*Reduction*), 2) refinamento (*Refinement*) e 3) substituição (*Replacement*), que significa a redução de animais utilizados na pesquisa, a melhora na condução dos estudos, no sentido de reduzir o sofrimento e a busca de métodos alternativos que venham substituir os testes *in vivo* (DIPASQUALE; HAYES, 2001).

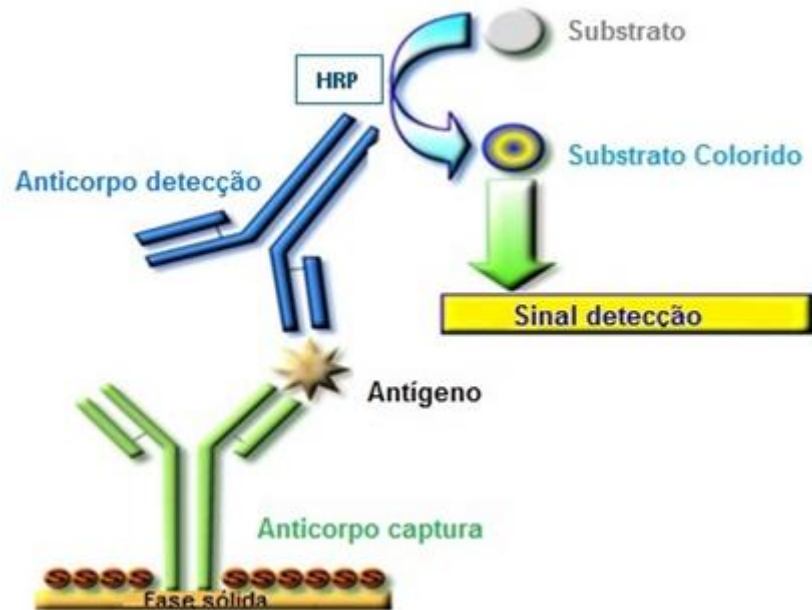
Desta forma, o método *in vitro* foi desenvolvido e validado, baseando-se em ensaio imunoenzimático – ELISA produto-específico para a avaliação da potência (COSTA, 2011; OMS, 2009).

O ensaio de potência da vacina é realizado *in vitro*, por meio de um ensaio imunoenzimático (ELISA) para a quantificação do HBsAg presente. Para isso, utiliza-se uma vacina de Referência de Trabalho, testada em paralelo às vacinas em análise, para cada produtor, conforme especificado pela Farmacopeia Brasileira (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; DIASORIN, [S.d.]).

O ELISA é realizado usando-se um kit comercial que contém: a) microplacas, cujos poços são revestidos com anticorpos monoclonais específicos para os diferentes epítomos do HBsAg; b) soluções para controles positivo e negativo; c) solução de conjugado, contendo anticorpos caprinos marcados com peroxidase de rábano contra o HBsAg; d) solução de lavagem; e) solução de substrato, contendo 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio (DIASORIN, [S.d.]).

O princípio básico da reação de um ELISA está na propriedade das proteínas (anticorpos ou antígenos) serem facilmente adsorvidos a superfícies sólidas, dentre elas, as plásticas. Assim, a partir do momento que um dos compostos (anticorpo ou antígeno) encontra-se imobilizado, a separação entre os compostos que se ligaram e os que estão livres pode ser feita por sucessivos processos de lavagens da placa (Figura 7). O resultado do ELISA é uma reação cromogênica que pode ser avaliada pela simples observação ou por espectrofotômetros específicos (MARTINEZ et al., 1999; TIJSEN, et al., 1993).

Figura 7 - Representação esquemática do ensaio ELISA tipo sanduíche.



Fonte: (<https://www.cusabio.com/c-20659.html>).

Os valores das densidades ópticas encontradas são analisados, utilizando o método de linhas paralelas, para determinação das potências estimadas da amostra da vacina (OMS, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

A medida mais eficaz e com melhor custo benefício para a prevenção primária e controle da hepatite B é a vacinação.

Para avaliar a potência, como indicativo de consistência de produção, das vacinas disponibilizadas gratuitamente pelo PNI, o Setor de Vacinas Virais do Laboratório de Vacinas Virais, Biofármacos e Cultura de Células (LVVCC), do Departamento de Imunologia (DI) do INCQS/Fiocruz realiza o ensaio de potência *in vitro* desta vacina. Neste ensaio, quantifica-se o HBsAg presente na vacina em análise, comparando-a com uma referência de trabalho do mesmo produtor.

Assim, a relevância deste trabalho se baseia no fato de que, para que se possa continuar realizando os ensaios das vacinas oriundas deste produtor, deve-se estabelecer um novo lote de vacina de referência de trabalho antes do término do lote atualmente em uso.

Para tanto, o processo de seleção deve ser conduzido de forma que o novo lote candidato 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

Eleger um lote da vacina contra Hepatite B, candidato a ser utilizado como vacina de Referência de Trabalho Específica do Produto nos ensaios de potência de rotina.

3.2 Objetivos específicos

- Selecionar um lote candidato à vacina de referência de trabalho;
- Realizar pelo menos três ensaios para padronização da potência das vacinas contra hepatite B por dois analistas distintos em dias diferentes, testando o lote candidato e a vacina de referência atual em paralelo;
- Construir um gráfico de controle para análise de tendências a partir dos valores de absorbância obtidos nos ensaios, utilizando o *software* SPC Explorer RT® v. 04 (Quality America, Texas, EUA).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras de vacinas

Foi utilizada a vacina adsorvida contra Hepatite B, que consiste numa vacina não infecciosa, produzida a partir de DNA recombinante, em que o antígeno de superfície viral é expresso em células de leveduras (*Hansenula polymorpha*) e, posteriormente, é purificado e adsorvido em hidróxido de alumínio. Deve ser mantida em temperaturas de 2 °C a 8 °C, sem congelar (SERUM INSTITUTE OF INDIA, [S.d.]).

Cada frasco contém 10 mL de vacina em solução, correspondendo a 10 doses para adultos (maiores de 20 anos). Cada dose (1mL) contém 20 µg do antígeno de superfície do VHB adsorvidos em hidróxido de alumínio e com timerosal como conservante (SERUM INSTITUTE OF INDIA, [S.d.]).

4.1.1 Lote candidato à vacina de referência de trabalho – Lote A

Como critérios para a seleção do lote candidato à vacina de referência de trabalho, foram inicialmente selecionados os lotes com maior número de frascos entregues ao laboratório e, posteriormente, analisados os resultados de potência apresentados pelo produtor no protocolo resumido de produção e controle do produto, selecionando, assim, o lote candidato à Vacina de Referência de Trabalho.

O lote candidato recebeu a seguinte codificação: Lote A. Foram entregues ao laboratório 12 frascos dessa vacina, que se encontra dentro do prazo de validade (junho de 2020), e mantida de acordo com as recomendações do produtor.

4.1.2 Vacina de referência de trabalho atual – lote B

O lote da vacina recombinante contra hepatite B atualmente em uso como referência de trabalho no LVVCC apresenta-se em frascos contendo 10 mL de vacina em solução, com validade até abril de 2019. Seu título já é conhecido (44,8 µg/mL) e fora previamente estabelecido por meio de ensaios de potência realizados no laboratório.

4.2 Determinação da potência das vacinas contra Hepatite B

A determinação da potência das vacinas se baseia num teste imunoenzimático do tipo ELISA para a quantificação do HBsAg por espectrofotometria. Para isso, utiliza-se o Kit Murex HBsAg Version 3® do fabricante DiaSorin.

A metodologia segue o Procedimento Operacional Padrão (POP) n.º 65.3430.033 rev. 07 (INCQS, 2017) estabelecido e aprovado pelo INCQS/Fiocruz.

4.2.1 Condições gerais para a realização do ensaio

O lote candidato (A) e a vacina de referência atual (B) foram submetidos a cinco ensaios de potência em paralelo, realizados por dois analistas distintos, em dias diferentes, cujos resultados foram avaliados frente a critérios de aceitação de ensaios (CAE) por meio de análises estatísticas dos desvios de linearidade e paralelismo.

O lote candidato só pode ser utilizado se os valores de potência observados por meio da análise de tendências dos gráficos de controle se mantiverem dentro dos limites de aceitação.

4.2.2 Diluições das amostras de vacinas

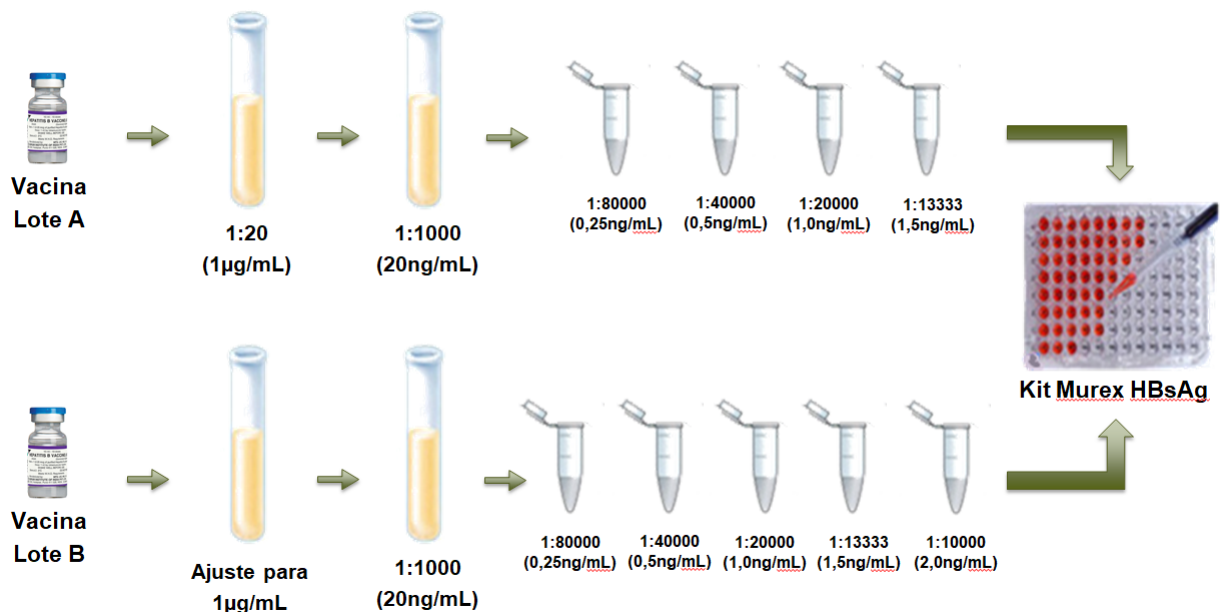
Para a diluição das vacinas, utilizou-se uma solução tampão fosfato-salino (PBS) acrescido de 0,2% de albumina sérica bovina (BSA).

As vacinas dos lotes A e B foram pré-diluídas para obter uma solução de aproximadamente 1 µg/mL: para a vacina do lote A, considerou-se a concentração descrita no frasco, de 20 µg/mL, diluindo-se 50 µL da vacina em 950 µL de PBS/BSA; e para a vacina do lote B, cuja titulação já fora realizada previamente, foi considerado o valor de 44,8 µg/mL, diluindo-se 22,3 µL da vacina em 977,7 µL de PBS/BSA.

Em outro tubo do mesmo tipo foram adicionados 20 µL da solução de 1 µg/mL e 980 µL diluente da amostra (PBS/ BSA 0,2%) para obter uma concentração de 20 ng/mL de cada vacina.

A partir da concentração de 20 ng/mL, a vacina do lote B (atual referência de trabalho) foi diluída para as concentrações de 0,25 ng/mL; 0,50 ng/mL; 1,0 ng/mL; 1,5 ng/mL e 2,0 ng/mL em triplicatas e a vacina A nas concentrações de 0,25 ng/mL; 0,50 ng/mL; 1,0 ng/mL e 1,5 ng/mL, em triplicatas, conforme ilustrado na figura 8. As vacinas e suas diluições foram homogeneizadas antes de serem usadas, evitando, assim, o depósito dos antígenos adsorvidos pelo alumínio.

Figura 8 - Esquema das pré-diluições e diluições para realização do ELISA.



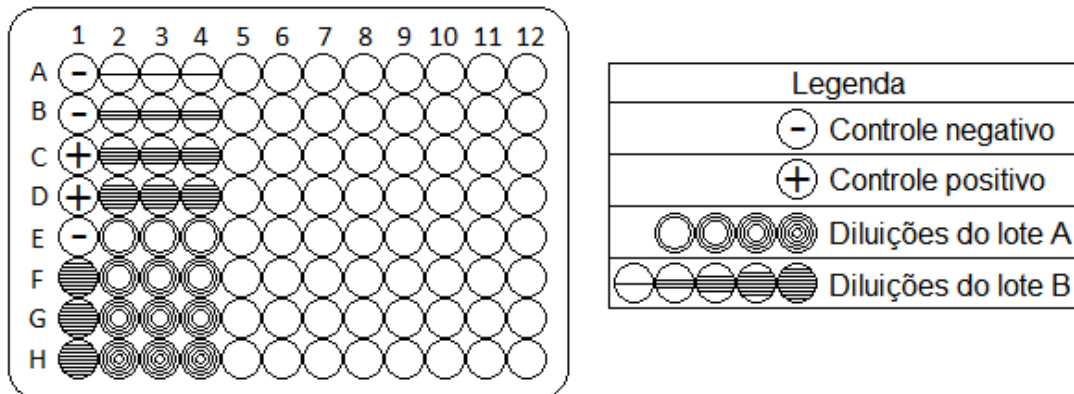
Fonte: (Do autor, 2019).

4.2.3 Metodologia do Kit Comercial Murex HBsAg

Conforme apresentado na figura 9, foram distribuídos 100 µL das triplicatas das vacinas diluídas e dos controles positivo e negativo nos poços da microplaca que, posteriormente, foi incubada a 37 °C ± 1 °C durante uma hora, para que ocorresse a ligação entre o HBsAg presente na vacina e os anticorpos monoclonais específicos para os diferentes epítomos do HBsAg que revestem os poços. Foram adicionados 50 µL do conjugado, contendo anticorpos caprinos marcados com peroxidase de rábano contra o HBsAg, e incubados novamente a 37 °C ± 1 °C durante 30 minutos. Os poços foram lavados com solução de lavagem, eliminando os antígenos e anticorpos que não se ligaram. Posteriormente, foi adicionado 50 µL do substrato (3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio), que por sua vez se ligou ao conjugado, catalisando a reação, permitindo a alteração de cor para

púrpura nos poços reativos. Após a incubação, adicionou-se a solução de parada de reação (Ácido sulfúrico 2M) e a placa foi lida em aparelho espectrofotômetro (BioTek, ELX 800, Estados Unidos) com absorvância de cada cavidade a 450nm.

Figura 9 - Distribuição das triplicatas das diluições e dos controles positivo e negativo na microplaca.



Fonte: (Do autor, 2019).

4.3 Leitura e avaliação estatística dos resultados

Os resultados de absorvância da medição fotométrica das diluições das vacinas dos lotes A e B foram avaliados por meio de *software* estatístico CombiStats® v.5.0 (EDQM, Council of Europe), pela análise de linhas paralelas, avaliando-se desvios de linearidade e paralelismo, calculando, assim, uma potência estimada da vacina com seus limites de confiança.

Na avaliação de desvios de paralelismo e ou linearidade nas curvas dose resposta, deve-se buscar o melhor ajuste das curvas removendo-se até duas diluições da vacina de referência de trabalho atual (0,25 e/ou 2,0 ng/mL) e uma da vacina candidata à referência (0,25 ou 1,5 ng/mL), e/ou retirando um resultado de uma das triplicatas de cada diluição.

Os valores de absorvância de cada diluição foram incluídos num gráfico de controle para análise de tendências, utilizando o *software* SPC Explorer RT® v. 04 (Quality America, Texas, EUA) para estabelecer os limites máximo e mínimo aceitos para cada diluição.

4.4 Critérios de Aceitação do Ensaio (CAE)

Para que os testes sejam aceitos, são avaliados os seguintes critérios:

- a) O valor de DO do controle negativo deve ser inferior a 0,2
- b) O valor de DO do controle positivo deve ser 0,8 superior à média do controle negativo

Quando os resultados não atingirem estes critérios, o ensaio deve ser repetido.

A potência da amostra da vacina é considerada conforme quando o valor encontrado no ensaio for maior ou igual a 75% do valor rotulado no frasco da vacina.

Os limites de confiança da potência estimada devem estar entre 80 e 125% para o ensaio ser aprovado.

4.5 Garantia da qualidade dos resultados

Além de manter os equipamentos e instrumentos pertinentes ao ensaio devidamente calibrados, verificados, monitorados e com a manutenção sendo realizada periodicamente, o lote da vacina de referência de trabalho é acompanhado por meio do lançamento dos resultados de absorvância em gráfico de controle de valores individuais utilizando o software SPC Explorer RT® v. 04 para garantir a qualidade dos resultados.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação da potência das vacinas contra Hepatite B

Os Anexos C, D, E, F e G apresentam os resultados obtidos nos cinco ensaios realizados para eleger o novo lote de referência de trabalho.

A tabela 1 apresenta os valores de potência estimada calculados em cada ensaio, com seu respectivo analista e limites de confiança.

Tabela 1 – Resultados dos cinco ensaios com seus respectivos analistas, datas de realização dos ensaios, potências estimadas do lote A (candidato à vacina de referência de trabalho) e limites de confiança mínimo e máximo.

Ensaio	Data	Analista	Limite mínimo	Potência estimada	Limite máximo
1	18 jul. 2018	1	85,9%	41,66 µg/mL	117,5%
2	19 jul. 2018	2	91%	38,39 µg/mL	110,2%
3	20 jul. 2018	2	88,9%	37,13 µg/mL	112,7%
4	23 jul. 2018	1	89,9%	37,48 µg/mL	111,7%
5	24 jul. 2018	1	92,7%	37,29 µg/mL	108,1%

Fonte: (Do autor, 2019).

A partir das potências estimadas, foram calculadas as médias de potência – 38,39 µg de HBsAg por mililitro de vacina – e de limites de confiança mínimo e máximo – 89,68% e 112,04%.

5.2 Gráfico controle para eleição do lote de referência de trabalho

Os resultados de absorvância de cada diluição foram plotados em um gráfico no programa SPC Explorer RT® v. 04, estabelecendo a média e os limites máximo e mínimo aceitos para cada diluição utilizada no ensaio para avaliação da potência da vacina contra hepatite B (0,25 – 0,5 – 1,0 – 1,5ng/mL), conforme apresentado na tabela 2.

Tabela 2 - Limites máximos e mínimos e médias dos gráficos controle para as diluições de 0,25ng/mL; 0,50ng/mL; 1,00ng/mL e 1,50ng/mL.

Diluição (ng/mL)	Limite máximo	Limite mínimo	Média
0,25	635,9	367,8	501,9
0,50	1064,5	541,3	802,9
1,00	1749,9	960,2	1355,1
1,50	2739,1	1370,3	2054,7

Fonte: (Do autor, 2019).

Os valores de absorvância das próximas leituras de cada diluição devem se manter dentro dos limites máximo e mínimo.

Os Anexos H, I, J e K apresentam os gráficos de controle para cada diluição.

6 DISCUSSÃO

Para a erradicação de doenças, deve-se aliar a vacinação com outras medidas de saúde pública, tais como uso de preservativos durante as relações sexuais, prevenção da transmissão vertical, controle da qualidade de bolsas de sangue, melhor acesso ao diagnóstico e tratamento e educação, para que o público em geral entenda a necessidade e segurança das vacinas (OMS, 2016a; BARTLETT; TYRING, 2009).

A vacina contra hepatite B está incluída no PNI, sendo, portanto, disponibilizada gratuitamente à população. Todos os órgãos que fazem parte do programa são orientados por normas técnicas estabelecidas pelo MS, incluindo informações sobre o modo correto de conservação, manipulação, transporte e aplicação da vacina, assegurando, assim, a sua aceitação e uniformidade de uso em todo o território nacional (BRASIL, 2017e).

A vacina submetida a condições inadequadas de preservação pode apresentar uma redução significativa da potência, além de ser mais propensa a causar reações locais, como abscessos estéreis (KARTOGLU et al., 2010; OMS, 1998).

Estudos demonstram que a vacina contra a hepatite B se mantém estável durante até quatro anos a temperaturas entre 2 °C e 8 °C, durante meses de 20 °C a 25 °C, durante semanas a 37°C e durante dias a 45 °C. O ponto de congelamento desta vacina é de cerca de -0,5 °C (OMS, 1998).

O congelamento acidental pode ocorrer em todos os segmentos da cadeia de frio, tanto em países desenvolvidos quanto em subdesenvolvidos. Tal como acontece com outras vacinas adsorvidas em sais de alumínio, o congelamento da vacina contra hepatite B provoca a quebra das ligações entre o adjuvante (alumínio) e o antígeno (HBsAg), levando à formação de grânulos de alumínio que sedimentam rapidamente. Quando os ciclos de congelamento e descongelamento são repetidos, os grânulos parecem aumentar em tamanho e peso (KARTOGLU et al., 2010).

Dentre os ensaios para a avaliação da consistência de produção, é realizado o ensaio de avaliação de potência (NETTO, 2010). A potência corresponde à capacidade específica do produto para efetuar um resultado determinado, conforme indicado por testes laboratoriais adequados ou por dados clínicos controlados adequadamente, obtidos pela administração da forma pretendida (FDA, 2013a).

Testes de potência quantitativos são geralmente considerados necessários para avaliar a atividade biológica do componente ativo de uma vacina e também podem servir como uma importante medida da estabilidade do produto. Testes de estabilidade do produto são essenciais para selecionar um período apropriado para expiração, bem como para futuras extensões do período de validade. Na maioria dos casos, os parâmetros de estabilidade (por exemplo, potência) são avaliados pela utilização de dados em tempo real, em condições ideais de armazenamento (OMS, 1998).

A utilização de uma única referência para todos os produtores de vacina contra hepatite B não é recomendada, visto que cada laboratório desenvolve uma metodologia específica associada a uma espécie de levedura para a fabricação de vacinas, acarretando numa diversidade na reatividade de vacinas produzidas por essas diferentes técnicas de fabricação, inclusive, pelas diferenças nos adjuvantes usados para a formulação (OMS, 2010).

Devido às diferenças nos processos de fabricação e populações vacinadas, a quantidade de proteína HBsAg por dose que induzirá uma resposta imune protetora difere nos vários produtos vacinais. O padrão para a dose pediátrica contém 5 µg – 10 µg de HBsAg e a dose padrão para adultos é de 10 µg – 20 µg. No entanto, a eficácia das diferentes vacinas não pode ser avaliada apenas com base nas diferenças no conteúdo do HBsAg, essa eficácia depende da presença de anti-HBs após a conclusão do esquema de vacinação (OMS, 2017d).

Vários fatores inerentes ao indivíduo influenciam na resposta protetora da vacina, podendo resultar em taxas de resposta inferiores, como a idade (maiores de 60 anos), obesidade, tabagismo e doenças crônicas (OMS, 2017d).

O presente estudo descreveu o processo para a eleição de um novo lote de vacina de Referência de Trabalho utilizado nos ensaios para a avaliação da potência das vacinas adsorvidas hepatite B.

Os ensaios foram realizados utilizando o kit Murex HBsAg Version 3® do fabricante DiaSorin. Os resultados de densidade óptica do controle negativo do kit se mantiveram inferiores a 0,2 e os controles positivos atingiram valores de absorbância 0,8 superiores à média dos controles negativos, validando, assim, o kit.

Conforme preconizado pela OMS (2011), os resultados dos ensaios para estabelecimento de vacinas de referência foram submetidos a avaliações estatísticas. Os resultados das leituras determinados pelo leitor de microplacas

foram incluídos numa planilha de cálculos já validada no programa Combistats® v 5.0, utilizando o teste de linhas paralelas para a avaliação de desvios de linearidade e paralelismo nas curvas dose resposta e cálculo dos limites de confiança máximo e mínimo.

Todos os resultados de potências obtidos pelos dois analistas apresentaram valores superiores a 75% do valor rotulado no frasco da vacina (20 µg de HBsAg/mL), não apresentaram desvios de linearidade e paralelismo, e se mantiveram dentro dos limites de 80 e 125%. Os resultados de todas as diluições se mantiveram dentro dos limites estabelecidos pelos gráficos de controle, em conformidade com o preconizado no POP 65.3430.033 (INCQS, 2017).

7 CONCLUSÃO

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

- A vacina do lote A apresentou resultados satisfatórios e em conformidade com o recomendado pelo POP 65.3430.033 (INCQS, 2017), mantendo-se maior ou igual a 75% do valor rotulado no frasco da vacina (20 µg de HBsAg/mL), e apresentando linearidade e paralelismo;
- As absorvâncias de cada diluição se mantiveram dentro dos limites estabelecidos pelo gráfico de controle na análise de tendências;
- O lote A atendeu aos requisitos necessários para se tornar o novo lote de vacina de referência de trabalho.

8 PERSPECTIVAS

Após a avaliação dos resultados obtidos nos ensaios, as amostras de vacinas do lote A serão utilizadas como referência de trabalho, sendo analisadas concomitantemente a outras amostras, para permitir que se estime a potência dos novos lotes.

REFERÊNCIAS

BARTLETT, Brenda L.; TYRING, Stephen K. Safety and efficacy of vaccines. **Dermatologic therapy**, v. 22, n. 2, 2009

BHAMIDIMARRI, Kalyan Ram; MARTIN, Paul. 43. Acute viral hepatitis. **Clinical Infectious Disease**. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 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**, 22 out 2008. Disponível em: www.anvisa.gov.br/legis. Acessado em: 01 set. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Hepatites Virais em números**. 2013. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pagina/hepatites-virais-em-numeros>. Acesso em: 20 set. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe técnico - **Introdução da vacina pentavalente**. 2012. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_tecnico_vacina_pentavalente.pdf. Acesso em: 20 set. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de normas e procedimentos para vacinação**. Brasília, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Rede de Frio do Programa Nacional de Imunizações**. Brasília, 2017e.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de vigilância em saúde**. Brasília, 2017a. v. 2.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual técnico para o diagnóstico das hepatites virais**. Brasília, 2017b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Informe técnico: Campanha Nacional de Multivacinação para Atualização da Caderneta de Vacinação da Criança e do Adolescente**. Brasília, 2017c.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite c e coinfeções**. Brasília, 2017d.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Hepatites Virais 2018. **Boletim Epidemiológico**, v. 49. 2018a.

BRASIL. Lei n. 6259, de 30 de outubro de 1975. Dispõe sobre a organização das ações de Vigilância Epidemiológica, sobre o Programa Nacional de Imunizações, estabelece normas relativas à notificação compulsória de doenças, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 31 out. 1975. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L6259.html. Acesso em: 28 jan. 2019.

BRASIL. Decreto n. 78231, de 12 de agosto de 1976. Regulamenta a Lei nº 6.259, de 30 de outubro de 1975, que dispõe sobre a organização das ações de Vigilância Epidemiológica, sobre o Programa Nacional de Imunizações, estabelece normas relativas à notificação compulsória de doenças, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 13 ago. 1976. Disponível em: <http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1970-1979/decreto-78231-12-agosto-1976-427054-publicacaooriginal-1-pe.html>. Acesso em: 28 jan. 2019.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Programa Nacional de Imunizações: 30 Anos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual dos centros de referência para imunobiológicos especiais. Brasília, 2006. Disponível em: http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/-01VACINA/manual_crie_.pdf. Acesso em: 25 dez. 2018.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Hepatites virais: O Brasil está atento**. 3. ed. Brasília, 2008.

COSTA C.I. *et al.* Establishment and validation of an ELISA for the quantitation of HBsAg in recombinant hepatitis B vaccines. *Journal of Virological Methods*, v. 172, p. 32-37, 2011.

DIASORIN. Kit Murex HBsAg version 3®: bula de kit diagnóstico. Inglaterra, [S.d.]

DIPASQUALE, L.C.; HAYES, A.W. Acute toxicity and eye irritancy. In: HAYES, A.W. *Principles and methods of toxicology*. 4. ed. London: Taylor & Francis, 2001. ap. 18, p.853-916.

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

FDA. CITE: 21CFR 600.3. Code of Federal Regulations. Title 21, v. 7, 2013a.

FATTOVICH, Giovanna. Natural history of hepatitis B. *Journal of hepatology*, v. 39, p. 50-58, 2003.

FONSECA, José Carlos Ferraz da. Natural history of chronic hepatitis B. *Revista da sociedade brasileira de medicina tropical*, v. 40, n. 6, p. 672-677, 2007.

FREITAS, Alexandre Coutinho Teixeira de et al. Estudo comparativo em pacientes cirróticos portadores e não portadores de carcinoma hepatocelular submetidos ao transplante hepático: análise do meld, do tempo em lista de espera e da sobrevida. Curitiba, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3430.033**: avaliação da potência da vacina adsorvida hepatite B (recombinante). Rev. 7. Rio de Janeiro, 2017.

KARIMZADEH, H. *et al.* Validation of an in-vitro method for Hepatitis B vaccine potency assay: specification setting. *Panminerva medica*, v. 52, n. 3, p. 177, 2010.

KARTOGLU, Ümit *et al.* Validation of the shake test for detecting freeze damage to adsorbed vaccines. **Bulletin of the World Health Organization**, 2010.

LAMBERT, Paul-Henri; LIU, Margaret; SIEGRIST, Claire-Anne. Can successful vaccines teach us how to induce efficient protective immune responses? *Nature medicine*, v. 11, n. 4s, p. S54, 2005.

LEE, Jung Min; AHN, Sang Hoon. Quantification of HBsAg: basic virology for clinical practice. *World journal of gastroenterology: WJG*, v. 17, n. 3, p. 283, 2011.

LOCARNINI, Stephen. Hepatitis B viral resistance: mechanisms and diagnosis. *Journal of hepatology*, v. 39, p. 124-132, 2003.

MARTÍNEZ, J.C. *et al.* Validation de un ELISA para la cuantificación de inmunoglobulinas séricas humanas anti polisacárido capsular de *Salmonella typhi*. *Vaccine Monitor, Havana*, v.8 n.8, p. 7-10, 1999.

MARTÍNEZ, Yamila *et al.* Correlation of in vivo-in vitro potency assays for the Cuban Hepatitis B vaccine. *Biotecnologia Aplicada*, v. 22, n. 1, p. 34-36, 2005.

MEYER, O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. *Toxicology Letters*, v. 140-141, p.21-30, 2003.

MEIRELES, Liliane C.; MARINHO, Rui Tato; VAN DAMME, Pierre. Three decades of hepatitis B control with vaccination. *World journal of hepatology*, v. 7, n. 18, p. 2127, 2015.

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. **Recommendations to Assure the Quality, Safety and Efficacy of Recombinant Hepatitis B Vaccines**. 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Biologicals. Vaccine Hepatitis B**. 2014. Disponível em: http://www.who.int/biologicals/vaccines/Hepatitis_B/en/. Acesso em: 29 jan. 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **What is hepatitis?** 2016b. Disponível em: <http://www.who.int/features/qa/76/en/>. Acesso em: 17 jun. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global health sector strategy on viral hepatitis 2016 - 2021: towards ending viral hepatitis**. Geneva, 2016a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global hepatitis report - Infographics**. Genebra, 2017b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global hepatitis report 2017**. Genebra, 2017a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccines**. Geneva, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Hepatitis B Vaccines: WHO position paper. **Weekly epidemiological record**, v. 92, n. 27, p. 369-392, 2017d.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Hepatitis B Vaccines. **Weekly Epidemiological Record**, v. 84, p. 405-420, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global Programme for Vaccines and Immunization. **Thermostability of vaccines**. Geneva, 1998.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **São Paulo Declaration on HepatitisWorld Hepatitis Summit 2017**. São Paulo, 2017c. Disponível em: <http://www.who.int/hepatitis/news-events/sao-paulo-declaration-on-hepatitis.pdf>. Acesso em: 29 ago. 2018.

PARANÁ, Raymundo *et al.* Diversidade Genômica do vírus da Hepatite B. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 1, 2009.

RONCATO, Malgarino; BALLARDIN, Patrícia Andreia Zanetti; LUNGE, Vagner Ricardo. Influência dos genótipos no tratamento da hepatite B. **Rev HCPA**, v. 28, n. 3, p. 188-93, 2008.

SCHAEFER, Stephan. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 13, n. 1, p. 14, 2007.

SCHECHTMAN, L. M. Implementation of the 3 Rs (Refinement, reduction and replacement): Validation and regulatory acceptance considerations for alternative toxicological test methods. **ILAR Journal**, v. 43, supl, p.S85-S94, 2002.

SERUM INSTITUTE OF INDIA. **Vacina hepatite B®. Bula de vacina. [S.d.]**.

SEWELL, Edward C.; JACOBSON, Sheldon H.; WENIGER, Bruce G. "Reverse engineering" a formulary selection algorithm to determine the economic value of pentavalent and hexavalent combination vaccines. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 20, n. 11, p. S45-S56, 2001.

TIJSSSEN, P. The immobilization of immunoreactants on solid phases. In: BURDON, R.H.; VAN KNIPPENBERG, P.H. **Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: practice and theory of enzyme immunoassays**. Amsterdam: Elsevier, p.297-328, 1993.

TEMPORÃO, José Gomes. O Programa Nacional de Imunizações (PNI): origens e desenvolvimento. **História**, v. 10, n. 1, p. 601-617, 2003.

Calendário Nacional de Vacinação 2018

Grupo Etário	Idade	BCG	Hepatite B	Penta/DTP	VIP/VOP	Pneumocócica 10V (conjugada)*	Rotavírus Humano	Meningocócica C (conjugada)*	Febre Amarela **	Hepatite A****	Triplice Viral	Tetra viral*****	Variçela**	HPV*****	Dupla Adulto	dTpa*****
Crianças	Ào nascer	Dose única	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															
	9 meses			3ª dose	3ª dose (com VIP)				***Dose única							
	12 meses							Reforço								
	15 meses			1º reforço (com DTP)	1º reforço (com VOP)					Um a dose						
	4 anos			2º reforço (com DTP)	2º reforço (com VOP)								Um a dose			
Adolescente	9 anos															
	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 (meninas de 9 a 14 anos) 2 doses (meninos de 11 a 14 anos)	Reforço a cada (10 anos)	
Adulto	20 a 59 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)	
	60 anos ou mais		3 doses (verificar a situação vacinal)						Dose única (não vacinado ou sem comprovante de vacinação)						Reforço a cada (10 anos)	
Gestante			3 doses (verificar a situação vacinal)													
			3 doses (verificar a situação vacinal)												3 doses (verificar a situação vacinal)	Um a dose a cada 10 anos (verificar a situação vacinal)

Nota: **Administrar Um a dose da vacina Pneumocócica 10V (conjugada) e da vacina Meningocócica 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.

** Indicação às pessoas residentes ou viajantes para as áreas com recomendação de vacina. Atentar às precauções e contraindicações para vacinação.

***Indicação para os residentes dos municípios das áreas ampliatas para vacinação que anteriormente eram áreas SEM recomendação para vacinação dos estados de SP, RJ, PR, RS, 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 tetraviral corresponde à segunda dose da vacina varicela. Esta vacina está disponível para crianças até 6 anos 11 meses e 29 dias.

*****C responde 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 perderem a oportunidade de serem vacinadas durante o período gestacional, administrar uma dose de dTpa no puerpério, o mais precocemente possível. A vacina dTpa também será oferecida para profissionais de saúde que atuam em maternidade e em unidade de internação neonatal (UTI/UCI convencional e UCI canguru) atendendo recém-nascidos e crianças menores de 1 ano de idade.

ANEXO B – RECOMENDAÇÕES DO MINISTÉRIO DA SAÚDE PARA VACINAÇÃO CONTRA HEPATITE B EM GRUPOS ESPECIAIS

Vacinação anti-hepatite B em outros grupos especiais

Condição	Dose/Esquema	Sorologia pós-vacinação
Fibrose cística	Três doses com esquema de zero/1/6 meses	Não é necessária
Hepatopatia crônica, portadores de VHC	Três doses com esquema de zero/1/6 meses	Sim
Diabetes <i>mellitus</i>	Três doses com esquema de zero/1/6 meses	Sim
Doenças de depósito tais como Gaucher, Nieman Pick, Mucopolissacaridoses tipos I e II, Glicogenoses	Três doses com esquema de zero/1/6 meses	Não é necessária
Transplante de órgãos sólidos e pacientes com neoplasias e/ou que necessitem quimioterapia, radioterapia, corticoterapia e outras imunodeficiências	Quatro doses com o dobro da dose para a idade, com esquema de zero/1/2/6 a 12 meses	Sim
Transplantados de medula óssea	Três doses com esquema de zero/1/6 meses	Sim
Asplenia anatômica ou funcional, hemoglobinopatia e outras condições associadas à disfunção esplênica	Três doses com esquema de zero/1/6 meses	Não é necessária
Pacientes com doenças hemorrágicas e politransfundidos	Três doses com esquema de zero/1/6 meses	Sim
Profissionais de saúde	Três doses com esquema de zero/1/6 meses	Sim
Renais crônicos, pré-diálise	Quatro doses com o dobro da dose para a idade, esquema de zero/1/2/6 meses	Sim. Repetir esquema para os não reagentes
Renais crônicos, hemodialisados	Quatro doses com o dobro da dose para a idade, esquema de zero/1/2/6 meses	Sim. Repetir esquema para os não reagentes. Retestar anualmente e fazer reforço para os que apresentarem títulos menores que 10 UI/mL na retestagem

Fonte: (Secretaria da Saúde do Paraná. Disponível em: http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/-01VACINA/manual_crie_.pdf. Acesso em: 25 dez.2018).

ANEXO C – 1º ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE LOTE CANDIDATO À VACINA DE REFERÊNCIA DE TRABALHO – ANALISTA 1

Amélabis Version 5.0. Wednesday, 7 November 2018, 10:13:37 [-03:00]. Page 1 of 1



Substance	Vacina Hepatite B
Method	Elisa
Assay number	932/18
Technician	Thaís
Date of assay	18/07/2018

Remarks: Teste de uso para Hepatite B

Standard					
Id.	3864/2016				
Ass. pot.	20 µg/ ml				
Doses	1/80000	1/40000	1/20000	1/13333	1/10000
(1)	0.385	0.530	0.868	1.198	1.346
(2)	0.389	0.840	0.862	1.325	1.383
(3)	0.420	0.600	0.901	1.283	1.325

Sample 1					
Id.	932/2018				
Ass. pot.	? µg/ml				
Doses	1/80000	1/40000	1/20000	1/13333	1/10000
(1)	0.556	0.880	1.581	2.061	
(2)	0.553	0.858	1.591	2.204	
(3)	0.689	0.921	1.577	2.313	

Model: Parallel lines

Design: Completely randomised

Transformation: $y' = \ln(y)$

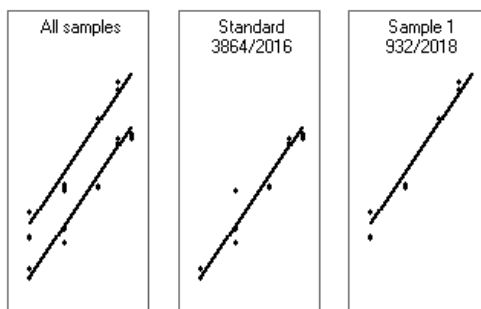
Variance: Observed residuals

Common slope(factor) = 0.641499 (0.590185 to 0.692813)

Correlation |r|: 0.978713

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F-ratio	Probability
Preparations	1	0.623865	0.623865	56.850	0.000 (***)
Regression	1	5.32044	5.32044	484.829	0.000 (***)
Non-parallelism	1	0.0460087	0.0460087	4.193	0.060
Non-linearity	5	0.0617492	0.0123498	1.125	0.392
Standard	3	0.0415958	0.0138653	1.263	0.325
Sample 1	2	0.0201534	0.0100767	0.918	0.422
Treatments	8	6.05207	0.756508	68.937	0.000 (***)
Residual error	14	0.153634	0.0109739		
Total	22	6.20570	0.282077		

Sample 1			
Id.	932/2018		
(µg/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	35.7996	41.6589	48.9606
Rel. to Ass.	?	?	?
Rel. to Est.	85.9%	100.0%	117.5%



Executed by:

Calculated by:

Approved by:

ANEXO D – 2º ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE LOTE CANDIDATO À VACINA DE REFERÊNCIA DE TRABALHO – ANALISTA 1

Version 5.0. Wednesday, 7 November 2018, 10:14:24 [-03:00]. Page 1 of 1



Substance	Vacina Hepatite B
Method	Elisa
Assay number	932/18
Technician	Inah
Date of assay	19/07/2018

Remarks: Teste de uso para Hepatite B

Standard					
Id.	3864/2016				
Ass. pot.	20 µg/ ml				
Doses	1/80000	1/40000	1/20000	1/13333	1/10000
(1)	0.321	0.466	0.899	1.230	1.436
(2)	0.394	0.570	0.912	1.258	1.206
(3)	0.380	0.566	0.717	1.196	1.268

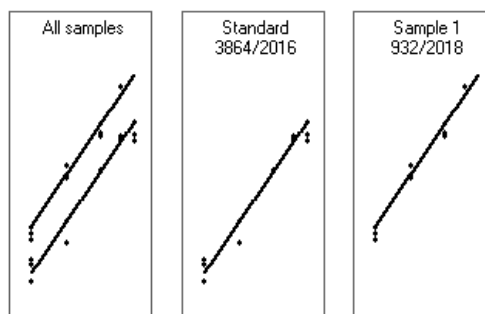
Sample 1					
Id.	932/2018				
Ass. pot.	? µg/ml				
Doses	1/80000	1/40000	1/20000	1/13333	1/10000
(1)	0.478	0.876	1.414	2.003	
(2)	0.532	0.853	1.283	2.232	
(3)	0.508	0.947	1.263	2.005	

Model: Parallel lines
Design: Completely randomised
Transformation: $y' = \ln(y)$
Variance: Observed residuals

Common slope(factor) = 0.679184 (0.644039 to 0.714329)
Correlation |r|: 0.987194

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F-ratio	Probability
Preparations	1	0.386424	0.386424	71.266	0.000 (****)
Regression	1	6.17246	6.17246	>1000	0.000 (****)
Non-parallelism	1	0.0211581	0.0211581	3.902	0.066
Non-linearity	5	0.0633483	0.0126697	2.337	0.090
Standard	3	0.0364152	0.0121384	2.239	0.123
Sample 1	2	0.0269331	0.0134665	2.484	0.115
Treatments	8	6.64339	0.830424	153.151	0.000 (****)
Residual error	16	0.0867560	0.00542225		
Total	24	6.73015	0.280423		

Sample 1			
Id.	932/2018		
(µg/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	34.9363	38.3872	42.3024
Rel. to Ass.	?	?	?
Rel. to Est.	91.0%	100.0%	110.2%



Executed by:

Calculated by:

Approved by:

ANEXO E – 3º ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE LOTE CANDIDATO À VACINA DE REFERÊNCIA DE TRABALHO– ANALISTA 2

OméStat5 Version 5.0. Wednesday, 7 November 2018, 10:38:43 [-03:00]. Page 1 of 1



Substance	Vacina Hepatite B
Method	Elisa
Assay number	932/18
Technician	Inah
Date of assay	20/07/2018

Remarks: Teste de uso para Hepatite B

Standard					
Id.	3864/2016				
Ass. pot.	20 µg/ ml				
Doses	1/80000	1/40000	1/20000	1/13333	1/10000
(1)	0.307	0.499	0.810	1.125	1.044
(2)	0.353	0.425	0.775	1.057	1.436
(3)	0.365	0.531	0.771	1.07	1.378

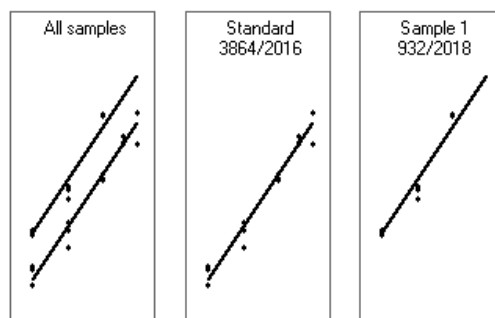
Sample 1					
Id.	932/2018				
Ass. pot.	? µg/ml				
Doses	1/80000	1/40000	1/20000	1/13333	1/10000
(1)	0.474	0.729	1.368	2.902	
(2)	0.495	0.656	1.402	2.046	
(3)	0.491	0.703	1.338	2.054	

Model: Parallel lines
 Design: Completely randomised
 Transformation: $y' = \ln(y)$
 Variance: Observed residuals

Common slope(factor) = 0.655286 (0.610149 to 0.700424)
 Correlation r : 0.980622

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F-ratio	Probability
Preparations	1	0.0211988	0.0211988	3.209	0.095
Regression	1	4.31937	4.31937	653.821	0.000 (****)
Non-parallelism	1	0.0129987	0.0129987	1.968	0.182
Non-linearity	4	0.0677566	0.0169391	2.564	0.084
Standard	3	0.0237948	0.00793159	1.201	0.346
Sample 1	1	0.0439618	0.0439618	6.654	0.022 (*)
Treatments	7	4.42132	0.631618	95.608	0.000 (****)
Residual error	14	0.0324889	0.00660635		
Total	21	4.51381	0.214943		

Sample 1			
Id.	932/2018		
(µg/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	32.9964	37.1259	41.8306
Rel. to Ass.	?	?	?
Rel. to Est.	88.9%	100.0%	112.7%



Executed by:

Calculated by:

Approved by:

ANEXO F – 4º ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE LOTE CANDIDATO À VACINA DE REFERÊNCIA DE TRABALHO – ANALISTA 2

OmniStat Version 5.0. Wednesday, 7 November 2018, 10:39:19 [-03:00]. Page 1 of 1



Substance	Vacina Hepatite B
Method	Elisa
Assay number	932/18
Technician	Thaís
Date of assay	23/07/2018

Remarks: Teste de uso para Hepatite B

Standard					
Id.	3864/2016				
Ass. pot.	20 µg/ ml				
Doses	1/80000	1/40000	1/20000	1/13333	1/10000
(1)	0.301	0.529	0.738	1.014	1.352
(2)	0.354	0.516	0.914	1.168	1.508
(3)	0.35	0.544	0.922	1.597	1.431

Sample 1					
Id.	932/2018				
Ass. pot.	? µg/ml				
Doses	1/80000	1/40000	1/20000	1/13333	1/10000
(1)	0.601	0.883	1.415	1.987	
(2)	0.435	0.804	1.425	2.024	
(3)	0.457	0.741	1.314	2.077	

Model: Parallel lines

Design: Completely randomised

Transformation: $y' = \ln(y)$

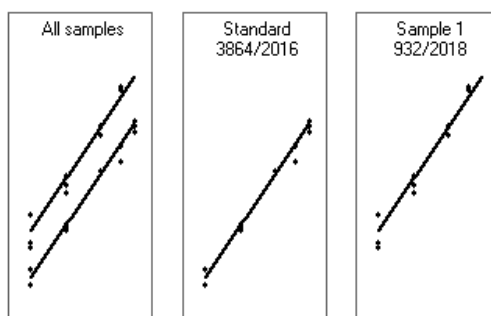
Variance: Observed residuals

Common slope(factor) = 0.726624 (0.684155 to 0.769094)

Correlation |r|: 0.989136

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F-ratio	Probability
Preparations	1	0.484201	0.484201	63.596	0.000 (****)
Regression	1	6.84933	6.84933	899.605	0.000 (****)
Non-parallelism	1	0.0234856	0.0234856	3.085	0.099
Non-linearity	5	0.0242935	0.00485869	0.638	0.674
Standard	3	0.0138642	0.00462139	0.607	0.621
Sample 1	2	0.0104293	0.00521465	0.685	0.519
Treatments	8	7.38131	0.922663	121.185	0.000 (****)
Residual error	15	0.114206	0.00761371		
Total	23	7.49551	0.325892		

Sample 1			
Id.	932/2018		
(µg/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	33.6870	37.4841	41.8755
Rel. to Ass.	?	?	?
Rel. to Est.	89.9%	100.0%	111.7%



Executed by:

Calculated by:

Approved by:

ANEXO G – 5º ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE LOTE CANDIDATO À VACINA DE REFERÊNCIA DE TRABALHO – ANALISTA 1

em&stats Version 5.0. Wednesday, 7 November 2018, 10:40:17 [-03:00], Page 1 of 1



Substance	Vacina Hepatite B
Method	Elisa
Assay number	932/18
Technician	Thais
Date of assay	24/07/2018

Remarks: Teste de uso para Hepatite B

Standard					
Id.	3864/2016				
Ass. pot.	20 µg/ml				
Doses	1/80000	1/40000	1/20000	1/13333	1/10000
(1)	0.279	0.434	0.798	1.100	1.244
(2)	0.291	0.421	0.817	1.076	0.975
(3)	0.298	1.241	0.850	1.156	1.180

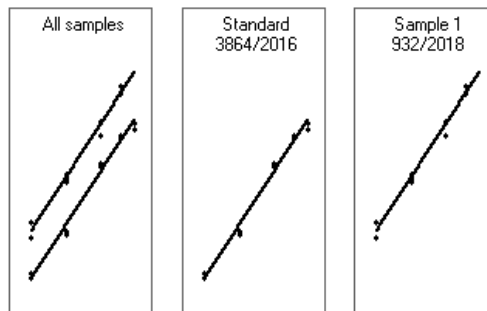
Sample 1					
Id.	932/2018				
Ass. pot.	? µg/ml				
Doses	1/80000	1/40000	1/20000	1/13333	1/10000
(1)	0.412	0.704	1.261	1.65	
(2)	0.371	0.730	0.989	1.57	
(3)	0.476	0.758	1.105	1.793	

Model: Parallel lines
Design: Completely randomised
Transformation: $y' = \ln(y)$
Variance: Observed residuals

Common slope(factor) = 0.740079 (0.708372 to 0.771786)
Correlation |r|: 0.993577

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F-ratio	Probability
Preparations	1	0.355427	0.355427	122.134	0.000 (****)
Regression	1	5.20817	5.20817	>1000	0.000 (****)
Non-parallelism	1	0.000194018	0.000194018	0.067	0.801
Non-linearity	5	0.0428746	0.00857491	2.947	0.069
Standard	3	0.0369660	0.0123220	4.234	0.036 (*)
Sample 1	2	0.00590853	0.00295427	1.015	0.397
Treatments	8	5.60666	0.700833	240.825	0.000 (****)
Residual error	10	0.0291014	0.00291014		
Total	18	5.63576	0.313098		

Sample 1			
Id.	932/2018		
(µg/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	34.5530	37.2893	40.3252
Rel. to Ass.	?	?	?
Rel. to Est.	92.7%	100.0%	108.1%

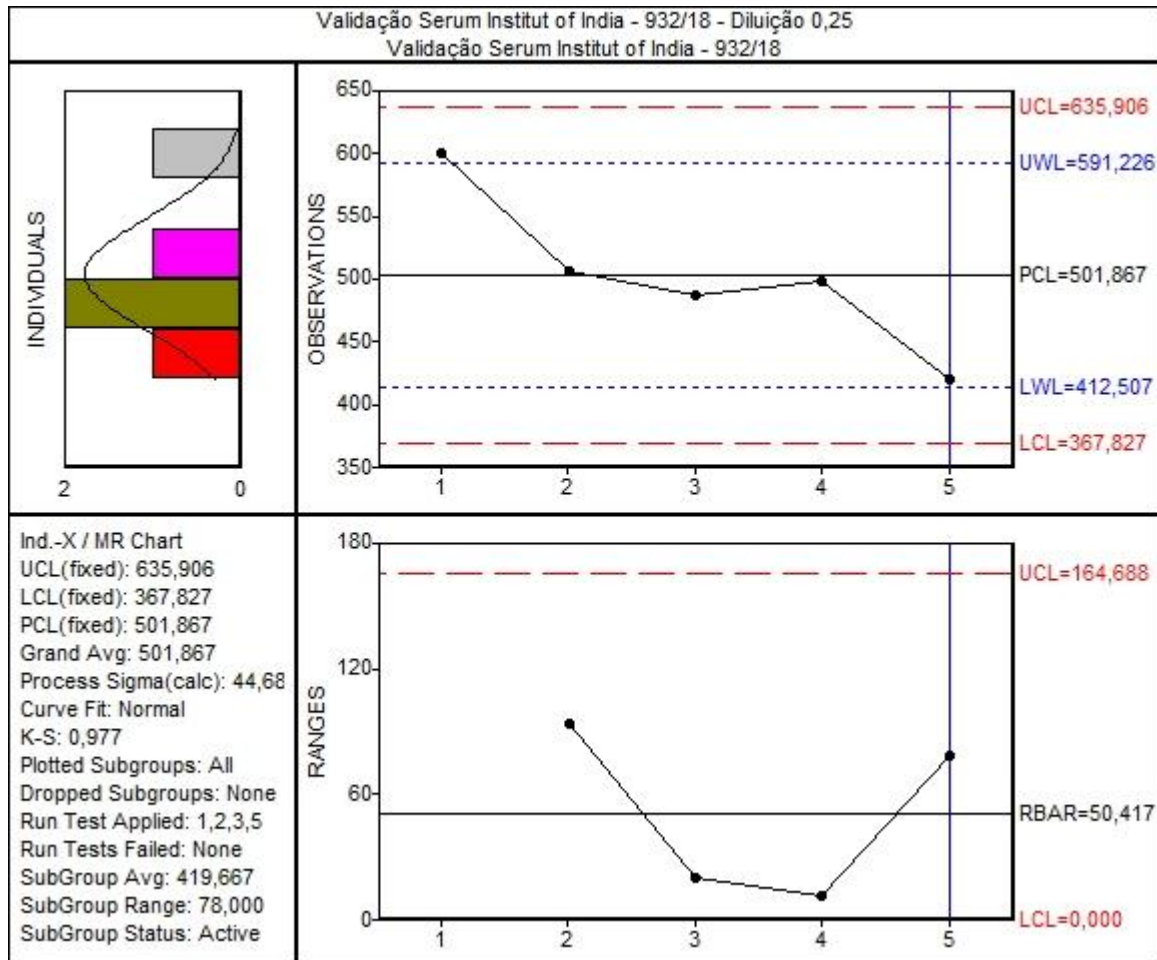


Executed by:

Calculated by:

Approved by:

ANEXO H – GRÁFICO CONTROLE PARA DILUIÇÃO DE 0,25 ng/mL DA AMOSTRA DO LOTE A

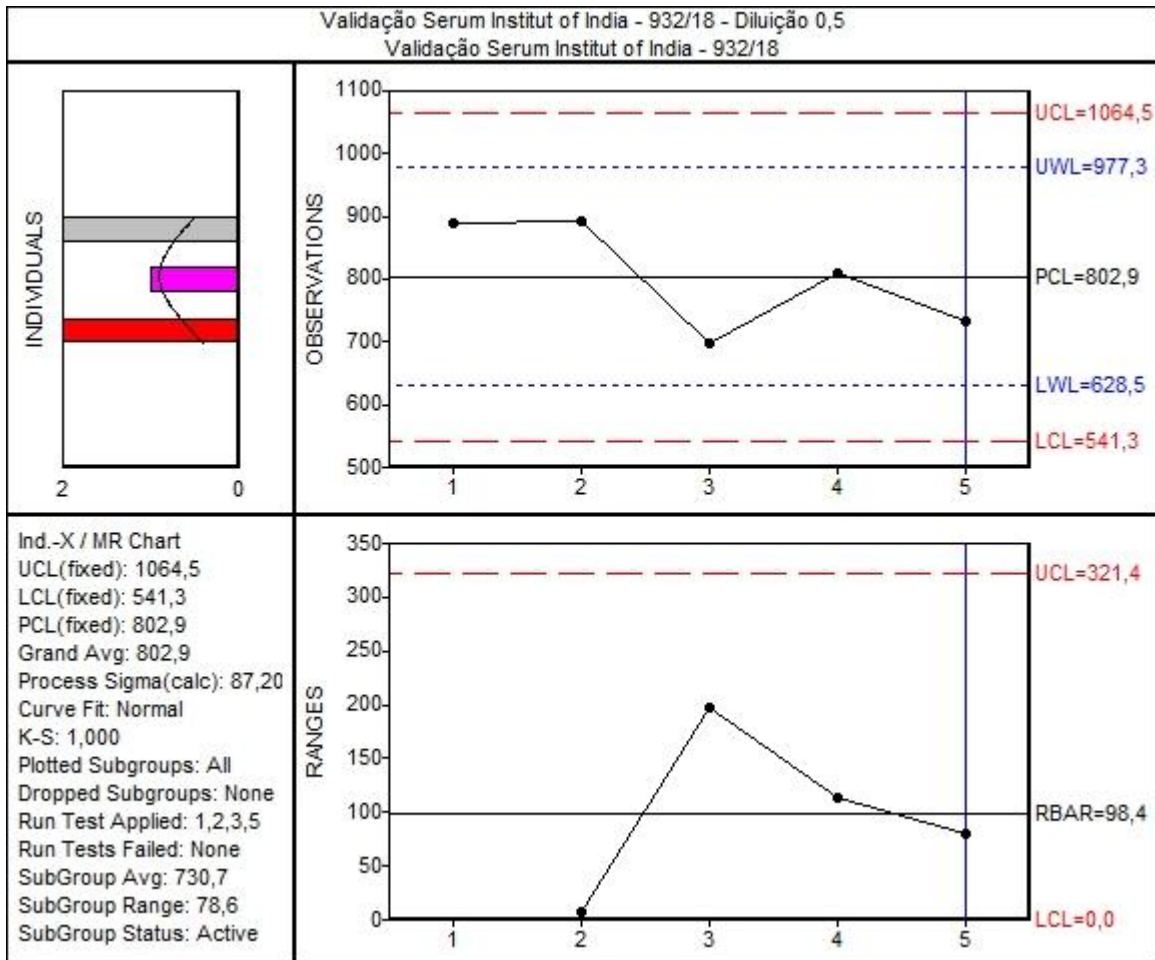


Grand Average: 501,867	Cpk:	Cp:	Cpm:
Process Sigma: 44,680	Ppk:	Pp:	Ppm:
Sample Sigma: 64,270	Skewness: 0,576	Kurtosis: 1,960	K-S: 0,977
Population Sigma: 57,485	Max Val: 599,333	Min Val: 419,667	Sum: 2509,333
Median:	Standard Error: 28,742	Sigma Level:	
Subgroups Out of Control:		Subgroups Failing Run Tests:	
Subgroups Dropped from Chart:		Subgroups Dropped from Statistics:	

Nº de ensaio	Data do ensaio	Diluição 0,25	Observação
1	18/07/2018	599,333	Lote do kit D529410
2	19/07/2018	506,000	Lote do kit D529410
3	20/07/2018	486,667	Lote do kit D529410
4	23/07/2018	497,667	Lote do kit D529410
5	24/07/2018	419,667	Lote do kit D529410

Fonte: (Do autor, 2019).

ANEXO I – GRÁFICO CONTROLE PARA DILUIÇÃO DE 0,50 ng/mL DA AMOSTRA DO LOTE A

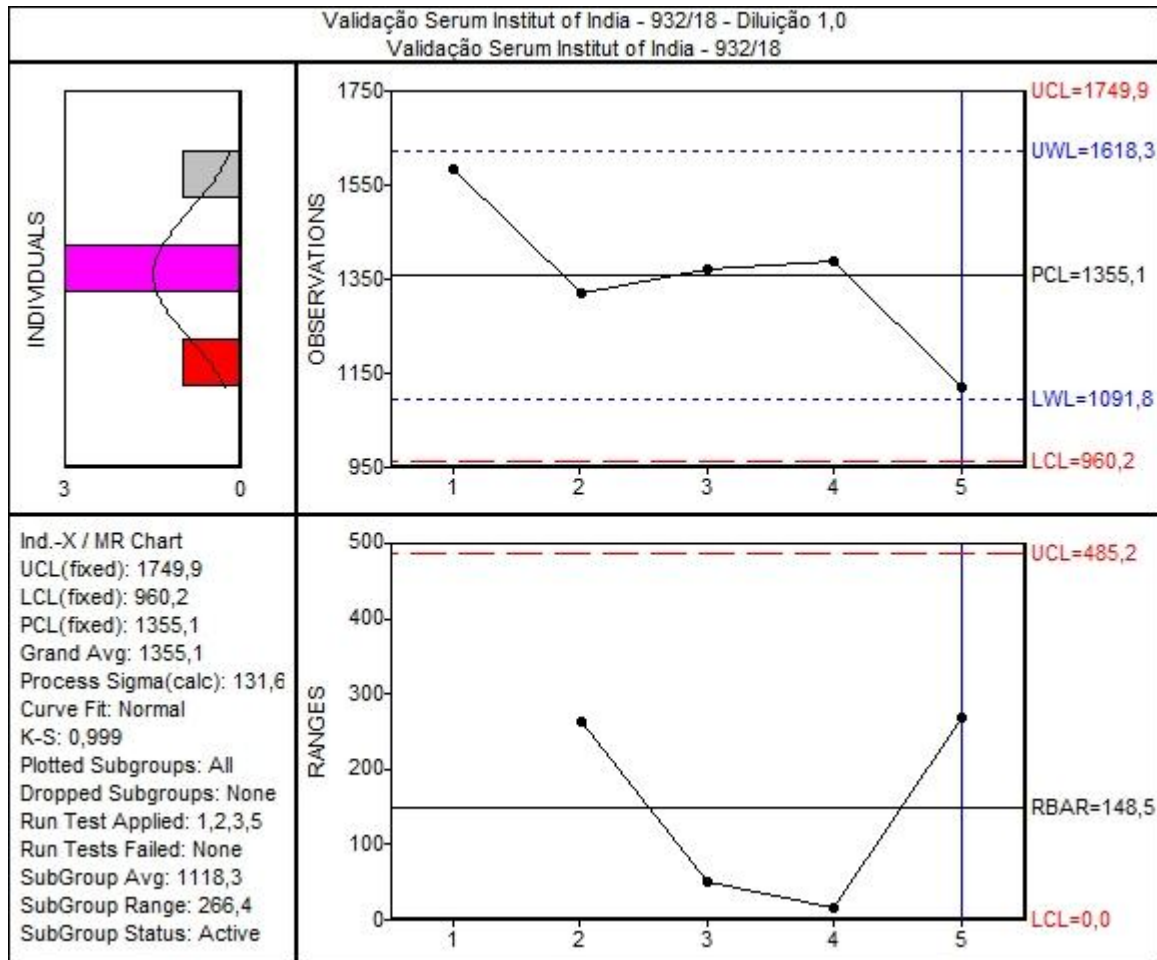


Grand Average: 802,9	Cpk:	Cp:	Cpm:
Process Sigma: 87,2	Ppk:	Pp:	Ppm:
Sample Sigma: 88,8	Skewness: -0,2	Kurtosis: -2,6	K-S: 1,0
Population Sigma: 79,5	Max Val: 892,0	Min Val: 696,0	Sum: 4014,3
Median:	Standard Error: 39,7	Sigma Level:	
Subgroups Out of Control:		Subgroups Failing Run Tests:	
Subgroups Dropped from Chart:		Subgroups Dropped from Statistics:	

Nº de ensaio	Data do ensaio	Diluição 0,5	Observação
1	18/07/2018	886,3	Lote do kit D529410
2	19/07/2018	892,0	Lote do kit D529410
3	20/07/2018	696,0	Lote do kit D529410
4	23/07/2018	809,3	Lote do kit D529410
5	24/07/2018	730,7	Lote do kit D529410

Fonte: (Do autor, 2019).

ANEXO J – GRÁFICO CONTROLE PARA DILUIÇÃO DE 1,00 ng/mL DA AMOSTRA DO LOTE A

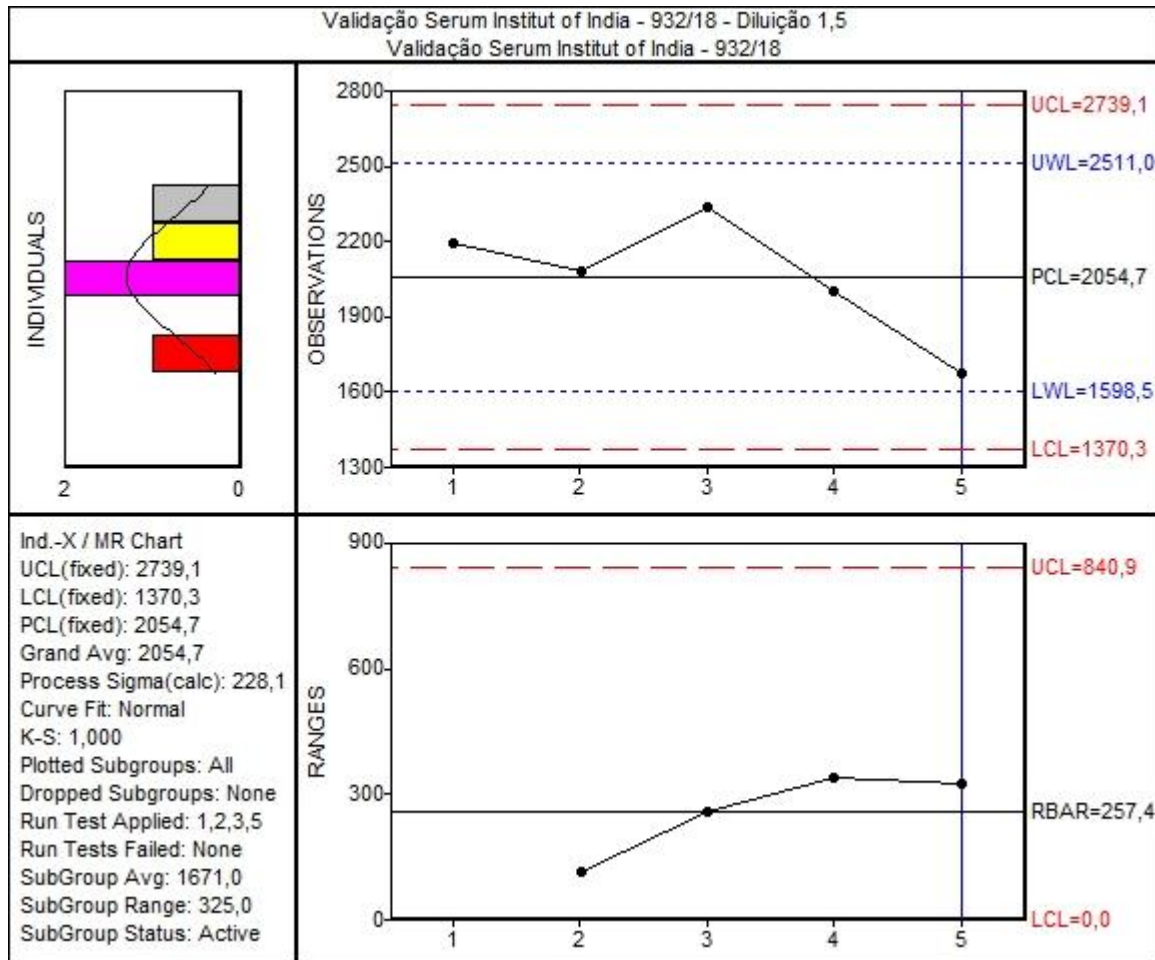


Grand Average: 1355,1	Cpk:	Cp:	Cpm:
Process Sigma: 131,6	Ppk:	Pp:	Ppm:
Sample Sigma: 166,1	Skewness: -0,1	Kurtosis: 1,6	K-S: 1,0
Population Sigma: 148,5	Max Val: 1583,0	Min Val: 1118,3	Sum: 6775,3
Median:	Standard Error: 74,3		Sigma Level:
Subgroups Out of Control:		Subgroups Failing Run Tests:	
Subgroups Dropped from Chart:		Subgroups Dropped from Statistics:	

Nº de ensaio	Data do ensaio	Diluição 1,0	Observação
1	18/07/2018	1583,0	Lote do kit D529410
2	19/07/2018	1320,0	Lote do kit D529410
3	20/07/2018	1369,3	Lote do kit D529410
4	23/07/2018	1384,7	Lote do kit D529410
5	24/07/2018	1118,3	Lote do kit D529410

Fonte: (Do autor, 2019).

ANEXO K – GRÁFICO CONTROLE PARA DILUIÇÃO DE 1,50 ng/mL DA AMOSTRA DO LOTE A



Grand Average: 2054,7	Cpk:	Cp:	Cpm:
Process Sigma: 228,1	Ppk:	Pp:	Ppm:
Sample Sigma: 249,2	Skewness: -0,9	Kurtosis: 1,1	K-S: 1,0
Population Sigma: 222,9	Max Val: 2334,0	Min Val: 1671,0	Sum: 10273,7
Median:	Standard Error: 111,4		Sigma Level:
Subgroups Out of Control:		Subgroups Failing Run Tests:	
Subgroups Dropped from Chart:		Subgroups Dropped from Statistics:	

Nº de ensaio	Data do ensaio	Diluição 1,5	Observação
1	18/07/2018	2192,7	Lote do kit D529410
2	19/07/2018	2080,0	Lote do kit D529410
3	20/07/2018	2334,0	Lote do kit D529410
4	23/07/2018	1996,0	Lote do kit D529410
5	24/07/2018	1671,0	Lote do kit D529410

Fonte: (Do autor, 2019).