

EDUARDO JORGE RABELO NETTO

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

PPGVS/ INCQS
FIOCRUZ
2010

**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**

Eduardo Jorge Rabelo Netto

Mestrado Profissional
Programa de Pós-Graduação em Vigilância
Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em
Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores: Prof.^a Dr.^a Isabella Fernandes Delgado
Prof.^a Dr.^a Kátia Christina Leandro Antunes

Rio de Janeiro
2010

Netto, Eduardo Jorge Rabelo

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 / Eduardo Jorge Rabelo Netto. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2010.

xiii, 68 f.; il., tab.

Orientadoras: Isabella Fernandes Delgado; Kátia Christina Leandro Antunes

Dissertação (Mestrado Profissional) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2010.

1. Vacina contra Febre Amarela 2. Controle da Qualidade 3. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Evaluation of the quality control of vaccines against yellow fever analyzed at the National Institute for Quality Control in Health from 2000 to 2008.

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

Eduardo Jorge Rabelo Netto

Dissertação submetida a Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

Prof. Dr. Antônio Eugênio C. C. de Almeida (FIOCRUZ/INCQS)

Prof.^a Dr.^a Maria Teresa Villela Romanos (UFRJ)

Prof.^a Dr.^a Karen Friedrich (FIOCRUZ/INCQS)

Orientadoras:

Prof.^a Dr.^a Isabella Fernandes Delgado

Prof.^a Dr.^a Kátia Christina Leandro Antunes

Rio de Janeiro
2010

- A minha mulher, Neide pela inspiração e incentivo, além do amor que me motivou a buscar o crescimento profissional
- Aos meus filhos, Carlos Eduardo, Suelen e Gisele pelo apoio, carinho e compreensão em todos os momentos.
- Aos meus pais, Manoel Netto e Iraci (*in memoriam*), que me deram amor, carinho e educação

AGRADECIMENTOS

- A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fiocruz.
- A Direção do INCQS, em especial ao Dr. Eduardo Chaves Leal e Dr. André L. Gemal, que diretamente ou indiretamente me ajudaram no cumprimento desta tarefa.
- Ao Programa Nacional de Imunizações do Ministério da Saúde, pelo auxílio em dados da vacina contra febre amarela.
- As Orientadoras Prof^ª. Dra. Isabella Fernandes Delgado e Prof^ª. Dra. Kátia Christina Leandro Antunes, por entenderem minhas dificuldades e ajudaram no desenvolvimento e aprimoramento desse trabalho.
- A Prof^ª. Dra. Karen Friedrich, pela força, orientação e pela amizade.
- Ao Prof. Dr. Wlamir Correa de Moura, pela ajuda que me dispensou, no início desta dissertação.
- A Rosicleia da Silva Marcelino, pela amizade e companheirismo.
- Aos amigos do Curso de Mestrado Profissional, pelo incentivo, amizade e apoio.
- Aos amigos do Departamento de Imunologia, pelas valiosas sugestões dadas durante esse trabalho.
- Aos amigos do INCQS por todo interesse e apoio que manifestaram durante esta minha jornada.
- Ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos da Fiocruz, em especial a Dra. Rita de Cássia E. Benedetti, Dra. Maria da Luz F. Leal e Dra. Darcy Akemi Hokama, por suas colaborações e todo apoio.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo (i) avaliar o processo de controle da qualidade relacionado às vacinas contra febre amarela utilizadas pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Ministério da Saúde no período de 2000 a 2008, através de levantamento de dados provenientes do Sistema de Gerenciamento de Amostras (SGA) do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e (ii) propor a utilização de gráficos de controle, como ferramentas úteis para a melhoria desse processo, a partir da análise comparativa dos resultados obtidos para vacinas nacionais e importadas, e da consistência de produção e detecção de tendências sistemáticas. Teve ainda como proposta (iii) a validação retrospectiva do teste de potência da vacina em questão, através da demonstração de sua confiabilidade (variabilidade e precisão) e do acompanhamento do desempenho da vacina de referência usada nos testes de potência e termoestabilidade. Compuseram a análise relativa ao controle da qualidade das vacinas contra febre amarela os seguintes parâmetros: (i.) análise do protocolo resumido de produção e controle emitido pelo fabricante, (ii.) teste de potência, (iii.) teste de termoestabilidade, (iv.) teste de determinação de ovalbumina, (v.) teste de esterilidade bacteriana e fúngica, (vi.) teor de umidade residual e (vii.) endotoxina bacteriana. Para confecção dos gráficos de controle foram estabelecidos os limites de controle (3 DP a partir da média) e limites de alerta (2 DP), calculados a partir dos 20 primeiros resultados a cada ano, como definido pela OMS (OMS, 1997) e através do programa SPC Explorer RT, versão 5.21 (Quality America Inc.). No período estudado ingressaram no INCQS 1031 lotes de vacinas contra febre amarela, produzidos por dois fabricantes distintos (97% pelo fabricante A e 3% pelo fabricante B), representando um total de 285 milhões de doses individuais. Desse total, 5 lotes do fabricante A (0,5% do total de lotes deste fabricante) foram considerados insatisfatórios (cerca de 1,7 milhões de doses), sendo três lotes no teste de esterilidade bacteriana e fúngica e dois lotes no teste de umidade residual. A avaliação dos gráficos de controle dos resultados de potência e de termoestabilidade mostraram que estes testes apresentam menor variação no INCQS do que no fabricante A. Além disso, no ano de 2007 foi possível observar um número significativo de valores do teste de potência deste fabricante abaixo do limite inferior de controle. Estes valores concentravam-se na segunda metade do gráfico, coincidindo com um período em que houve maior demanda pela vacina contra febre amarela, devido ao aumento no número de casos da doença no Brasil e em alguns países da América do Sul. Nossos resultados indicam ainda que no INCQS, o processo está sob controle estatístico e as causas especiais de variação, caso ocorram estão sendo controladas. Quanto à validação retrospectiva do teste de potência contra febre amarela no INCQS, concluímos que a exatidão foi de 0,19 (0,09-0,25), e recuperação de 96,14. A precisão total foi de 14,48%, sendo a repetitividade de 11,92% e precisão intermediária de 7,78% entre ensaios, e 7,80% entre analistas. Estes valores encontram-se satisfatórios e de acordo com o preconizado para ensaios biológicos por agências internacionais.

ABSTRACT

The present study aims at (i) evaluating the quality control process - from 2000 until 2008 – of the yellow fever vaccines used by the Brazilian Ministry of Health in the National Immunization Program (PNI), with data generated from the Sample Management System (SGA) of the National Institute of Quality Control in Health – INCQS - Oswaldo Cruz Foundation and (ii) proposing the use of control charts as useful tools to improve the process, using comparative analysis of the results obtained with Brazilian and imported vaccines, production consistency and systematic tendencies. The other purpose (iii) is the retrospective validation of yellow fever vaccine potency test, with the demonstration of its reliability (variability and precision) and the following up of the reference vaccine performance used in the potency and thermostability tests. The following parameters were used in the analysis of yellow fever vaccines: (i.) the manufacturer's resumed production and control protocol, (ii.) potency assay, (iii.) thermostability assay, (iv.) ovalbumine determination assay, (v.) bacterial and fungal sterility assay, (vi.) residual moisture content and (vii.) bacterial endotoxin. For the control charts, control limits were established from the calculation of 3 DP and for the alert limits, from 2 DP, after the first 20 results of each year, using the SPC Explorer RT, version 5.21 (Quality America Inc.), as determined by WHO (WHO, 1997). From 2000 until 2008, INCQS received 1031 yellow fever vaccine lots, produced by two different manufacturers (97% manufacturer A and 3% manufacturer B), representing a total of 285 million doses. Five lots produced by manufacturer A (0.5%), representing 1,7 million doses - were considered unsatisfactory: 3 due to bacterial and fungal contamination and 2 due to inadequate residual moisture content. Evaluation of the potency and thermostability control charts demonstrate that these assays present less variation at INCQS than at the manufacturer A. In 2007, a significant number of results were below the inferior limit of control. These values were concentrated in the second half of the graphic, when, coincidentally, there was a great demand of the vaccine, due to the increase of the number of cases of yellow fever in Brazil and in other South American countries. At INCQS, the process is under statistical control and the special causes of variation, in case they occur, are under control. Regarding the retrospective potency assay validation of yellow fever vaccines, we concluded that the accuracy was 0,19 (0,09-0,25) and recovery was 96,14%. The total precision was 14,48%; repetitivity was 11,92%; and intermediate precision 7,78% between assays and 7,8% between analysts. These values were satisfactory for biological assays according to international agencies.

LISTA DE ABREVIATURAS

AFSSAPS	Agence Francaise de Securite Sanitaire des Produits de Sante
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BCG	Bacilos Calmette e Guerin
CEME	Central de Medicamentos
CENEPI	Centro Nacional de Epidemiologia
CGPNI	Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações
DL50	Dose Letal 50%
DTP	Difteria, tétano e pertussis
DT	Difteria e tétano infantil
dT	Difteria e tétano adulto
DNPCD	Departamento Nacional de Profilaxia e Controle de Doenças
EAPV	Eventos Adversos Pós-Vacinação
FDA-CBER	Food and Drug Administration- Center for Biologics Evaluation and Research
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FSESP	Fundação de Serviços de Saúde Pública
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GT	Grupo de Trabalho
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilância e Medicamentos (da Colômbia)
LIA	Limite Inferior de Alerta
LIC	Limite Inferior de Controle
LSA	Limite Superior de Alerta
LSC	Limite Superior de Controle
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-americana de Saúde
ORF	Open reading frame
PASNI	Programa de Auto-Suficiência Nacional em Imunobiológicos
PNI	Programa Nacional de Imunizações
RNA	Ácido ribonucleico
RRNLCQV	Rede Regional Nacional de Laboratórios Oficiais de Controle de Qualidade de Vacinas
SGA	Sistema de Gerenciamento de Amostra
SIREVA	Sistema Regional de Vacinas
SNABS	Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde
UFP	Unidades Formadoras de Plaques
WHO	World Health Organization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pag.
Figura 1 – Ciclo de transmissão da febre amarela	11
Figura 2 – <i>Haemagogus Janthinomys</i>	12
Figura 3 – <i>Sabethes chloropterus</i>	12
Figura 4 – Áreas onde há risco de transmissão de febre amarela	13
Figura 5 – Áreas de risco para febre amarela silvestre	14
Figura 6 – Distribuição das formas clínicas	16
Figura 7 – <i>Aedes aegypti</i>	17
Figura 8 – <i>Aedes albopictus</i>	18
Figura 9 – Distribuição do <i>Aedes albopictus</i> no Brasil	18
Figura 10–Vacina contra febre amarela	23
Figura 11-Quantitativo de lotes de vacina contra febre amarela analisadas pelo INCQS (2000 – 2008)	35
Figura 12-Relação entre apresentações de 5, 10 e 50 doses de vacina contra febre amarela	36
Figura 13–Distribuição dos lotes analisadas no INCQS por fabricante (2000 – 2008)	38
Figura 14-Resultados de potência do fabricante A (a), do INCQS (b) e diferença (c) dos resultados dos lotes analisados em 2005	41
Figura 15-Resultados de potência do fabricante A (a), do INCQS (b) e diferença (c) dos resultados dos lotes analisados em 2006	43
Figura 16-Resultados de potência do fabricante A (a), do INCQS (b) e diferença (c) dos resultados dos lotes analisados em 2007	45
Figura 17-Resultados de potência do fabricante A (a), do INCQS (b) e diferença (c) dos resultados dos lotes analisados em 2008	47
Figura 18-Resultados de termoestabilidade do fabricante A (a), do INCQS (b) e diferença (c) dos resultados dos lotes analisados em 2005	49
Figura 19-Resultados de termoestabilidade do fabricante A (a), do INCQS (b) e diferença (c) dos resultados dos lotes analisados em 2006	50
Figura 20-Resultados de termoestabilidade do fabricante A (a), do INCQS (b) e diferença (c) dos resultados dos lotes analisados em 2007	52
Figura 21-Resultados de termoestabilidade do fabricante A (a), do INCQS (b) e diferença (c) dos resultados dos lotes analisados em 2008	53
Figura 22-Gráficos de controle dos valores obtidos pela vacina de referência (003) no laboratório de controle do INCQS em 2005, 2006, 2007 e 2008	55
	Pag.
Quadro 1 – Eventos adversos pós-vacinação (EAPV) contra febre amarela	22
Quadro 2 – Ensaios analíticos realizados no INCQS para a vacina contra febre amarela	24

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1 – Resultados insatisfatórios de lotes de vacinas contra febre amarela analisadas pelo INCQS entre 2000 e 2008	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 História das Vacinas	1
1.2 O Controle da Eficácia/Efetividade e da Segurança de Vacinas	2
1.3 O Programa Nacional de Imunizações	3
1.4 O Controle de Qualidade oficial e o fortalecimento na qualidade dos imunobiológicos no Brasil	4
1.5 Justificativa	6
1.6 Febre amarela: um problema de Saúde Pública	7
1.6.1 Histórico	7
1.6.2 Etiologia	9
1.6.3 Transmissão	10
1.6.4 Epidemiologia	12
1.6.5 Patogenia e Patologia	15
1.6.6 Diagnóstico e tratamento	16
1.6.7 Os vetores urbanos	17
1.6.8 Prevenção e controle	19
1.7 A vacina contra febre amarela	19
1.7.1 Controle de Qualidade da Vacina contra Febre Amarela	23
1.7.2 Determinação da Potência e Termoestabilidade da Vacina Contra Febre Amarela	25
1.8 Justificativa	26
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos Específicos	28
3 METODOLOGIA	29
3.1 Coleta dos dados gerais das amostras	29
3.2 Levantamento dos resultados dos fabricantes e INCQS quanto aos testes de potência e termoestabilidade	30
3.3 Confecção de gráficos de controle	30
3.4 Validação de ensaios analíticos	32
4 RESULTADOS/DISCUSSÃO	34

4.1 Total de lotes de febre amarela	34
4.2 Insatisfatoriedade dos lotes de febre amarela	36
4.3 Distribuição das amostras analisadas no INCQS por fabricante (2000 – 2008)	38
4.4 Avaliação da consistência de produção das vacinas contra febre amarela do fabricante A através da análise dos gráficos de controles de processo	39
4.5 Controle de potência e termoestabilidade da vacina de febre amarela no INCQS	54
4.5.1 Acompanhamento da vacina de referência de febre amarela	54
4.5.2 Validação do teste de potência da vacina de febre amarela no INCQS	56
4.6 Considerações finais	57
4.6.1 Acompanhamento de materiais de referência	57
4.6.2 Análise de tendências	57
4.6.3 Acompanhamento da consistência de produção	58
4.6.4 Satisfatoriedade da vacina contra febre amarela	59
5 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 História das Vacinas

O uso de produtos biológicos com a finalidade de prevenir doenças é antigo, sendo um dos primeiros registros datado do século VII da Era Cristã, segundo o qual na Índia praticava-se a ingestão de veneno de cobra com o objetivo de conferir proteção contra acidentes ofídicos. Nesse mesmo país, no século XVI, utilizava-se a inoculação do líquido extraído de lesões de pele humana para proteger contra a infecção com varíola (PLOTKIN & PLOTKIN, 1994).

Na Inglaterra em 1796, Edward Jenner demonstrou que a inoculação de líquido de lesões pustulares causadas pelo vírus da varíola bovina (*vaccinia*) em humanos, quando inoculadas na pele de outro indivíduo, produzia uma lesão similar e induzia imunidade contra a varíola humana (HENDERSON & FENNER, 1994). O médico francês Louis Pasteur, no final do século XIX, de certa forma inspirado nas experiências de Jenner, consagrou o termo vacinação para designar a inoculação de agentes infecciosos ou seus derivados com finalidade preventiva (HENDERSON & FENNER, 1994).

Durante os quase 90 anos decorridos entre o trabalho de Jenner e a primeira vacinação humana contra raiva por Pasteur, foram desenvolvidas teorias sobre atenuação da virulência e a necessidade de revacinação. Datam desse período, os primeiros registros relativos à preocupação com a segurança dos procedimentos de vacinação em face da identificação de casos de sífilis transmitida no processo de inoculação da *vaccinia*. Até essa experiência de Pasteur, a aceitação da vacinação restringia-se ao seu uso em animais, pois a aplicação em humanos ainda era vista com cautela (PLOTKIN & PLOTKIN, 1994).

No final do século XIX existiam poucas vacinas de uso em humanos, entre elas as vacinas contra a varíola, a raiva, a febre tifóide, a peste e a cólera. Nessa época, já havia sido desenvolvido grande parte dos conceitos e métodos empregados na produção e aplicação de vacinas (LEVINE, 1990).

Em 1899 o médico e cientista brasileiro Oswaldo Cruz, ganhou fama ao vencer a febre amarela, flagelo que, no final do século XIX, transformara o Rio de Janeiro num porto maldito, e combateu também a varíola e a peste bubônica. No entanto foi ferozmente atacado

por causa de suas campanhas sanitárias, tendo que enfrentar não só as doenças como a incompreensão de seus contemporâneos. A vacinação obrigatória contra a varíola, por ele proposta, provocou violenta revolta no Rio, em 1904.

Os fatos deram razão a Oswaldo Cruz. Graças à sua obstinação, a vacinação se tornou prática corriqueira no Brasil e a preocupação com a saúde pública se implantou em definitivo.

No decorrer do século XX surgiram importantes inovações tecnológicas aplicadas ao desenvolvimento e produção de novas vacinas. Na década de 1930, surge a introdução da utilização do embrião de galinha para o isolamento de vírus, em substituição ao uso de animais como furões e camundongos (PLOTKIN & PLOTKIN, 1994). Nos anos 40, Enders, Weller e Robbins introduzem a cultura celular com o mesmo objetivo (PLOTKIN & PLOTKIN, 1994). No entanto, é no final do século que temos o desenvolvimento da biologia molecular e a incorporação das técnicas de engenharia genética para a produção de vacinas, constituindo indiscutível avanço na direção da padronização desses produtos, além de torná-los mais efetivos e seguros (BASCH, 1994).

1.2 O Controle da Eficácia/Efetividade e da Segurança de Vacinas

O rápido e expressivo desenvolvimento das tecnologias médicas, abrangendo, além das vacinas, os medicamentos, as técnicas cirúrgicas e os procedimentos de diagnose, propiciou indiscutível avanço na prevenção no diagnóstico no controle e na terapêutica de doenças, criando condições para a diminuição de incapacidades, melhorando a qualidade e ampliando a expectativa de vida. Entretanto, o amplo uso dessas tecnologias torna necessária a aplicação de metodologias adequadas de avaliação da eficácia/efetividade e da segurança desses novos recursos (THACKER & BERKELMAN, 1986; WALDMAN, 1991).

Atualmente, em termos conceituais, as vacinas são definidas como produtos farmacêuticos que contém um ou mais agentes imunizantes em diversas formas biológicas. O produto final pode conter, além do agente imunizante, componentes originados dos substratos de produção, bem como conservantes, estabilizantes e antibióticos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2000). Apesar dos processos de produção e purificação terem atingido nos últimos anos elevado grau de qualidade, existe a possibilidade de efeitos indesejáveis, em virtude das vacinas serem constituídas por vários componentes biológicos e químicos (BRASIL, 1998; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2000).

À medida que a vacinação atua induzindo no indivíduo uma resposta imune, é plausível que determine também alguns eventos adversos. Por outro lado, muitas vezes processos que buscam aumentar a segurança de uma vacina, implicam numa diminuição de sua eficácia, portanto, nenhum produto biológico ou farmacêutico atinge níveis máximos de segurança e de eficácia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2000; CHEN; DESTEFANO, 1998). A incidência e a intensidade dos eventos adversos associados à vacinação variam conforme as características do produto, da susceptibilidade do indivíduo submetido à vacinação e da via de administração. Grande parte dos eventos induzidos por vacinas de uso humano é de caráter benigno e corresponde a distúrbios passageiros, como um leve desconforto que apresenta evolução autolimitada. Raramente, porém, podem ocorrer reações adversas mais graves, levando ao comprometimento temporário ou determinando seqüelas e até mesmo o óbito. Nem sempre os mecanismos dessas reações são conhecidos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2000).

Em todo o mundo, à medida que o uso das vacinas foi sendo ampliado, cresceu a preocupação com sua segurança, custo-benefício e eficácia/efetividade, determinando a elaboração de normas e regulamentações para o desenvolvimento desses produtos, com critérios não somente para sua aprovação e registro, mas também com preceitos éticos na forma pela qual são levadas a efeito as pesquisas. Entre as exigências para o desenvolvimento de novos produtos, temos a necessidade de que as pesquisas cumpram duas etapas, uma de ensaios pré-clínicos e a segunda de ensaios clínicos (LEVINE, 1990; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2000).

Apesar do rigor, os ensaios clínicos têm suas limitações em virtude do pequeno número de pessoas que são vacinadas, criando obstáculos para a identificação de reações adversas raras. Além disso, por questões éticas, os ensaios clínicos da fase pré-comercialização não incluem, por exemplo, gestantes e indivíduos com alguma doença de base. Por esses motivos, somente a partir da comercialização e do uso mais amplo da nova vacina é possível identificar eventos adversos menos freqüentes e grupos de indivíduos mais vulneráveis a esses eventos (CLEMENS; STANTON, 1990).

1.3 O Programa Nacional de Imunizações

Em 1973 foi formulado o Programa Nacional de Imunizações (PNI), por determinação do Ministério da Saúde, com o objetivo de coordenar as ações de imunizações que se

caracterizavam, até então, pela descontinuidade, pelo caráter episódico e pela reduzida área de cobertura. A proposta básica para o Programa, presente em documento elaborado por técnicos do Departamento Nacional de Profilaxia e Controle de Doenças (Ministério da Saúde) e da Central de Medicamentos (CEME - Presidência da República), foi aprovada em reunião realizada em Brasília, em 18 de setembro de 1973, presidida pelo próprio Ministro Mário Machado Lemos, contando com a participação de renomados sanitaristas e infectologistas, bem como de representantes de diversas instituições.

Em 1975 foi institucionalizado o PNI, resultante do somatório de fatores, de âmbito nacional e internacional, que convergiam para estimular e expandir a utilização de agentes imunizantes, buscando a integridade das ações de imunizações realizadas no país. O PNI passou a coordenar, assim, as atividades de imunizações desenvolvidas rotineiramente na rede de serviços e, para tanto, traçou diretrizes pautadas na experiência da Fundação de Serviços de Saúde Pública (FSESP), com a prestação de serviços integrais de saúde através de sua rede própria. A legislação específica sobre imunizações e vigilância epidemiológica (Lei 6.259 de 30.10.1975 e Decreto 78.231 de 30.12.1976) deu ênfase às atividades permanentes de vacinação e contribuiu para fortalecer institucionalmente o Programa. (<http://pni.datasus.gov.br/apresentação.asp>).

Em 2000, o PNI recebe a denominação de Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações (CGPNI), integrada pela Coordenação de Normatização e pela Coordenação de Imunobiológicos, ainda compondo o Cenepi/Funasa. Mais tarde, o Cenepi ganha o *status* de uma nova Secretaria do MS, a Secretaria de Vigilância em Saúde, e a CGPNI passa a compor o seu Departamento de Epidemiologia (TEMPORÃO; NASCIMENTO; MAIA, 2005).

1.4 O Controle de Qualidade oficial e o fortalecimento na qualidade dos imunobiológicos no Brasil

Em meados da década de 1970, a maioria das vacinas e soros utilizados nos brasileiros eram importados ou produzidos por laboratórios privados. Esses laboratórios descontentes com as novas políticas de saúde pública, interromperam a produção destes pelas exigências do Ministério da Saúde para a melhoria na qualidade da produção. Uma empresa multinacional que era responsável por 80% da produção de vacinas e soros antiofídicos no Brasil, assim como, outros laboratórios menores que também encerraram suas atividades causando assim,

problemas com fornecimento do mercado nacional de vacinas e soros. A situação do abastecimento com produtos de qualidade ficou bem crítica. No caso do soro antiofídico, não havia sequer a alternativa de importar, já que o soro, fabricado nos Estados Unidos, por exemplo, não protege contra mordida de cobras brasileiras, devido à especificidade de venenos de ofídios. Esse “desastre”, como descreve o periódico Pesquisa FAPESP (2003 apud HOMMA, [2003?]) foi o mote para que o país criasse o Programa de Auto-Suficiência Nacional em Imunobiológicos, (PASNI), em 1982. Nos primeiros dez anos, o Programa custou aos cofres públicos algo em torno de US\$ 120 milhões, nas contas de Homma, mas consolidou a infra-estrutura de produção de vacinas e soros no país. Reforçando este pensamento segundo o periódico Pesquisa FAPESP (2003 apud RAW, [2003?]) o Brasil estava capacitado para produzir vacinas e soros com tecnologia e preço adequados, todas testadas em seres humanos.

No início de 1983, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), assume a responsabilidade pelo controle oficial de todos os produtos e lotes dos imunobiológicos a serem utilizados pelo PNI; ao final de 1985, já eram realizadas análises laboratoriais das vacinas virais (pólio, sarampo, febre amarela e raiva) e bacterianas (BCG, DTP, DT, dT) e soros hiperimunes (antitóxicos, anti-teçonhentos e anti-rábico) adquiridos pelo programa oficial de imunização. (GEMAL; LEAL, 2005).

Após 1994, conforme critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS), os produtos, tanto os de origem nacional quanto os importados, passaram a ser liberados para consumo após análise laboratorial e análise de protocolo resumido de produção e controle de qualidade emitido pelo fabricante. O monitoramento permanente da qualidade de todos os lotes dos diferentes imunobiológicos foi fundamental para uma diminuição contínua do percentual de reprovação dos soros e vacinas utilizados na população (GEMAL; LEAL, 2005).

A qualidade e a importância do trabalho realizado no INCQS levam o Instituto a ter uma crescente inserção internacional, participando e coordenando estudos colaborativos para estabelecimento de padrões de referência e a harmonização de metodologias de controle de vários imunobiológicos na Rede Regional Nacional de Laboratórios Oficiais de Controle de Qualidade de Vacinas (RRNLCQV), apoiado pelo Sistema Regional de Vacinas da

1 PESQUISA FAPESP, 2003 apud HOMMA, [2003?].

1 PESQUISA FAPESP, 2003 apud RAW, [2003?].

Organização Panamericana de Saúde (SIREVA/OPAS), contando com a presença dos principais laboratórios de controle de qualidade da América Latina.

A partir de 1993, o INCQS passa a ser um dos laboratórios colaboradores da OMS a realizar análises laboratoriais em diferentes vacinas (BCG, Meningite Meningocócica, Pertussis, Raiva e Pólio) utilizadas em programas oficiais de imunização de outros países e/ou para avaliação da candidatura à pré-qualificação da OMS. 1 PESQUISA FAPESP, 2003 apud HOMMA, [2003?]

Como consequência de um acordo firmado com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), em reunião realizada em junho de 2002, em Brasília, o INCQS passa, a partir do início de 2003, a não mais realizar análise laboratorial em todos os lotes de algumas vacinas. A liberação dos laudos analíticos se dá após a verificação das informações descritas nos protocolos resumidos de produção e controle de qualidade do produto e, no caso de importados, também com base no certificado de liberação emitido pela autoridade regulatória do país de origem. Esta decisão levou em consideração três critérios básicos: (i) histórico de consistência de resultados analíticos satisfatórios ao longo dos anos; (ii) autorização de comercialização expedida pela ANVISA (registro sanitário); e (iii) histórico de eventos adversos. Este procedimento é sugerido como forma efetiva de controle de qualidade pela OMS e já vem sendo realizado pelos principais laboratórios oficiais dos países de tecnologia de ponta (GEMAL; LEAL, 2005).

1.5 Justificativa

Dentre os produtos biológicos analisados pelo INCQS, a vacina contra febre amarela constitui uma posição de destaque. O Brasil é o maior produtor mundial deste imunobiológico, com qualidade reconhecida e auto-suficiência de produção, tendo como produtor o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), pertencente a Fiocruz. É também o fornecedor oficial para OMS o que a torna de reconhecimento internacional.

Por outro lado a doença febre amarela, ainda hoje, constitui um problema de saúde pública para o Brasil, países da América do Sul, América Central e África. Nossa escolha, portanto, foi devido a termos no Brasil uma situação singular: o maior produtor mundial da

vacina, com qualidade e quantidade mas também possuir um número crescente de casos clínicos.

1.6 Febre amarela: um problema de Saúde Pública

1.6.1 Histórico

A febre amarela foi durante quatrocentos anos um desafio à Medicina, sendo ainda hoje, uma importante causa de morbidade e de alta letalidade, em vastas zonas das regiões tropicais da África e da América do Sul. A partir do século XVII, essa doença dizimou milhares de vidas em extensas epidemias urbanas nesses dois continentes (BENCHIMOL, 2001).

Desconhecida na antiguidade, sua história coincide com a descoberta do Novo Mundo. Não há registros de que a febre amarela já existisse no Novo Mundo antes das viagens do navegador genovês Cristóvão Colombo. Em 1495, durante a segunda expedição de Colombo, os espanhóis travaram contra os indígenas a batalha do Santo Serro, na ilha espanhola (Haiti). Cerca de dois meses depois daquela batalha, surgiu uma epidemia, tanto entre os europeus como entre os indígenas, fazendo numerosas vítimas. Os sintomas descritos, embora incompletos, levaram à conclusão de tratar-se de uma epidemia de febre amarela (FRANCO, 1969).

Evidências levam a crer que a febre amarela tenha sido introduzida na América tropical através dos navios que faziam o tráfico de escravos. Presume-se que a epidemia febril que atacou os conquistadores espanhóis na Península de Yucatan, em 1648, tenha sido febre amarela (STAMPLES & MONATH, 2008). Durante os séculos XVIII e XIX e início do século XX, a febre amarela foi o maior flagelo das regiões tropicais. Não há região no continente americano, que não tenha sido invadida, desde o sul, da Argentina e Chile, até o norte, no Canadá. As embarcações que navegavam em rotas transatlânticas constituíam uma fonte permanente de vítimas, com o vetor se proliferando nos recipientes de água doce, transformando a febre amarela na “praga dos mares”. A febre amarela afetou principalmente imigrantes europeus recém-chegados, não imunes. No início do século XIX uma grande epidemia dizimou as expedições francesas enviadas ao Haiti para debelar uma rebelião. Na região do Caribe foram descritas 83 epidemias no período de 1620 a 1900. Nos arredores de

Havana, em Cuba, o vírus permaneceu em atividade desde 1762 até o início deste século (BRASIL, 2004).

A primeira epidemia de febre amarela urbana no Brasil ocorreu em Recife /PE, em 1685. Há uma suposição de que a infecção amarílica tenha sido trazida para o Recife por um barco vindo da África (FRANCO, 1969). No ano seguinte, a doença foi detectada na Bahia, onde causou uma epidemia de grandes proporções com 25.000 casos e 900 óbitos. Em 1691, foi posta em prática oficialmente a primeira campanha sanitária no Brasil, em Recife /PE que resultou no controle e desaparecimento da doença. Após um longo período de silêncio, que durou mais de 150 anos, a febre amarela reapareceu em Salvador/BA, em 1849, causando 2.800 mortes. Neste mesmo ano, ocorreu a primeira epidemia no Rio de Janeiro, que acometeu mais de 9.600 pessoas e registrou 4.160 óbitos. No período entre 1850 e 1899, a doença se propagou pelo país, seguindo os caminhos da navegação marítima e fluvial, o que levou à ocorrência de epidemias em quase todas as províncias do Império, desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul. Em 1901, Emílio Ribas, diretor do Serviço Sanitário do Estado de São Paulo, com base na teoria de Finlay, promoveu na cidade de Sorocaba a primeira campanha contra a febre amarela, adotando medidas específicas contra o *Aedes aegypti*. Dois anos depois, em 1903, Oswaldo Cruz foi nomeado Diretor Geral de Saúde Pública e deu início à luta contra a doença, criando o Serviço de Profilaxia da Febre Amarela. Em 1909, a febre amarela foi considerada eliminada do Rio de Janeiro, capital do país. Em 1920, foi diagnosticado o primeiro caso de febre amarela silvestre no Brasil, no sítio Mulungú, município de Bom Conselho do Papa Caça/PE, mas somente em 1932 essa forma da doença foi reconhecida pela comunidade científica. A última epidemia registrada em um centro urbano ocorreu entre 1928 e 1929, no Rio de Janeiro, com a confirmação de 738 casos e 478 óbitos. A partir daí, a febre amarela urbana continuou a ocorrer de maneira pouco expressiva até 1942, quando foram registrados os três últimos casos no Acre, na cidade de Sena Madureira (BRASIL, 2004).

Nos últimos 50 anos algumas epidemias de febre amarela silvestre merecem destaque: a de maior magnitude ocorreu em 1952, com um registro de 221 casos, metade deles no estado de São Paulo, 67 em Minas Gerais, 29 no Paraná e outros 20 casos em Goiás, Mato Grosso e Acre. A partir daí, têm ocorrido epidemias de menor magnitude, porém com grande impacto social e econômico. Em 1973, uma epidemia em Goiás envolveu 36 municípios na transmissão com 60 casos confirmados e 38 óbitos. Na década seguinte, em 1984, uma epidemia na Região Norte, teve um saldo de 45 casos e 28 óbitos, sendo 64,4% no estado do

Pará. Entre 1993 e 1994 ocorreu uma epidemia de febre amarela silvestre no estado do Maranhão, envolvendo 4 municípios: Mirador, Barra do Corda, Esperantinópolis e Pastos Bons, com 87 casos, dos quais 12 foram a óbito. A partir de 1995 observou-se uma intensificação da circulação viral nos países vizinhos ao Brasil e com os quais compartilhamos ecossistemas, principalmente o Peru e a Bolívia. Estes dois países têm sido responsáveis por mais de 80% dos casos notificados nas Américas, enquanto no Brasil ocorreram 16% das notificações do continente. Em 1996 ocorreu um surto de febre amarela silvestre no estado do Amazonas, com 14 casos e 12 óbitos. A partir de 1998, registrou-se uma sequência de surtos iniciados no estado do Pará, com 23 casos e 9 óbitos, continuando em 1999/2000 nos estados do Pará, Tocantins, Goiás e outros, finalizando com um registro de com 161 casos e 68 óbitos. Entre 2001 e 2003, ocorreram 2 surtos no estado de Minas Gerais, o primeiro na região centro-oeste que contabilizou 32 casos e 16 óbitos; o segundo, na região nordeste, no Vale Jequitinhonha (Alto Jequitinhonha), iniciou-se no final de dezembro de 2002, prosseguindo a transmissão em 2003, com o registro final de 63 casos e 23 óbitos.

Publicações mais recentes da OMS citam 3 ocorrências de febre amarela no Brasil no ano de 2005, num total de 117 casos na América do Sul, que compreenderam Brasil, Bolívia, Colômbia, Peru e Venezuela (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2006). Em fevereiro de 2008, um aumento significativo de casos de febre amarela foi registrado pelo Ministério da Saúde brasileiro, que notificou um total de 30 casos, todos ocorridos entre dezembro de 2007 e janeiro de 2008 e confirmados por análise laboratorial. Estes casos incluíram 15 óbitos e ocorreram no Distrito Federal, Goiás e Mato Grosso (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2008^a e ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2008^b). Do total de 30 indivíduos acometidos, 28 não eram vacinados e outros dois haviam recebido a vacina há mais de 20 anos.

1.6.2 Etiologia

A febre amarela é uma arbovirose, transmitida por um díptero. (BRASIL, 2004).

A designação de arbovírus (*arthropod-borne viruses*) não possui qualquer significado taxonômico. Contudo, esta designação permitiu agrupar, até 2002, mais de 535 vírus de RNA, com envelope, que são transmitidos principalmente (mas não exclusivamente) por vetores artrópodes, tais como: mosquitos, mosca-da-areia, pulgas, carrapatos etc (FERREIRA & SOUZA, 2002).

O vírus da febre amarela pertence ao gênero **Flavivirus** (Flavus = amarelo) da família **Flaviviridae**, sendo protótipo desta família. Ele pertence ao mesmo gênero e família de outros vírus responsáveis por doença no homem, entre os quais o Dengue, o “West Nile”, o Rocio e a Encefalite de St. Louis. Embora apenas um sorotipo do vírus amarílico seja reconhecido, há pequenas alterações genéticas entre as cepas da América e da África que permitem dois e cinco genótipos, respectivamente, que não se distinguem quanto a patogenicidade. O vírus da febre amarela possui o genoma constituído de RNA de fita simples não segmentado de polaridade positiva, com cerca de 11 kilobases de comprimento. O vírion ou nucleocapsídeo mede cerca de 25-40nm de diâmetro e é envolvido pelo envoltório bilaminar de natureza lipoprotéica conhecido como envelope e que é originário da célula hospedeira. A partícula íntegra - vírion mais envelope - mede cerca de 40-50nm. A região ORF do RNA viral expressa a síntese de três proteínas estruturais (prM, E e C). Estas proteínas estruturais codificam a formação da estrutura básica da partícula viral; a proteína prM codifica o precursor da proteína da membrana (M), já a proteína E dá origem ao envelope, enquanto a proteína C codifica a formação do capsídeo viral. São essas proteínas que o organismo humano responde durante uma infecção com a produção dos anticorpos inibidores da hemaglutinação (IH) contra as glicoproteínas do envelope e neutralizantes (N) contra a proteína C do capsídeo. Por outro lado, as proteínas não estruturais são responsáveis pelas atividades reguladoras e de expressão do vírus incluindo replicação, virulência e patogenicidade. (VASCONCELOS, 2003).

Muito recentemente desconhecia-se a origem do vírus, não se sabendo se ele já existia na América antes do comércio de escravos vindos da África. Pesquisas utilizando ferramentas moleculares indicam que as amostras de febre amarela da América perderam parte de uma seqüência repetitiva do genoma, o que não ocorre nas amostras africanas inclusive na vacina 17D e na amostra protótipo Asibi da qual derivou a amostra vacinal. Isto praticamente encerra a polêmica, indicando que o vírus se originou na África (VASCONCELOS, 2003).

1.6.3 Transmissão

O vírus da febre amarela é mantido por dois ciclos básicos: um silvestre, onde os mosquitos responsáveis pela transmissão diferem na América e na África, e um ciclo urbano, onde o mosquito *Aedes aegypti* é o responsável pela disseminação nos dois continentes. No ciclo urbano, a transmissão pelo *Aedes aegypti* é feita diretamente ao homem passando pelo

período de incubação extrínseca, tornando-se vetor infectado e transmitindo o vírus a outras pessoas susceptíveis, iniciando o ciclo de transmissão: **homem** → *Aedes aegypti* → **homem** (Figura 1). O período de incubação extrínseca é o tempo em que o vetor se infectou até o momento a partir do qual ele se torna infectante, e levando, em média, de 9 a 12 dias sendo inversamente proporcional à temperatura. (BRASIL, 2004).

Na África, vários mosquitos do gênero *Aedes* estão associados com a transmissão durante o ciclo silvestre, sendo *Ae. africanus*, *Ae. furcifer* e *Ae. simpsoni*, os mais importantes. Os mosquitos, além de serem transmissores, são reservatórios do vírus, permanecendo infectados por toda a vida, já os macacos e os homens, quando infectados, morrem ou se curam, ficando imunes para sempre (VASCONCELOS, 2003).

Nas Américas, o ciclo silvestre é distinto do africano. Os responsáveis pela transmissão são os mosquitos do gênero *Haemagogus* (*Hg. janthinomys* – Figura 2, *Hg. albomaculatus* etc) e *Sabethes* (*Sa. Chloropterus* – Figura 3, *Sa. Soperi* etc). O *Hg. janthinomys* é o principal responsável pela transmissão da febre amarela. Este mosquito apresenta a maior distribuição geográfica conhecida entre as espécies desse gênero. Ele possui hábitos exclusivamente silvestres e pica o indivíduo que se expõe na floresta. Esta espécie mostra-se em melhores condições de transmissão do vírus amarílico, pois é extremamente suscetível ao mesmo. É primatófila, ou seja, se alimenta preferencialmente do sangue de macacos e, secundariamente, do homem, apresentando hábitos diurnos, coincidindo com o homem que realiza suas atividades ou incursões na mata (VASCONCELOS, 2003).

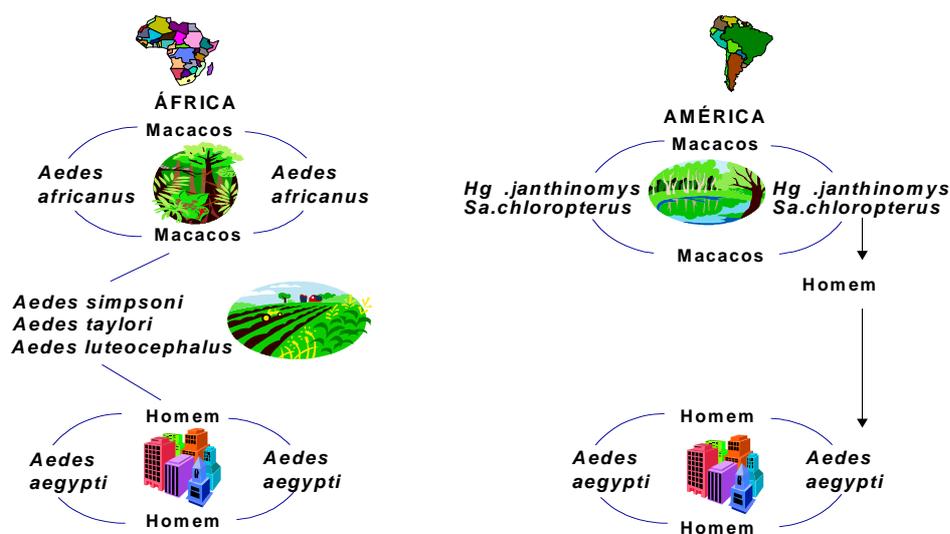


Figura 1: Ciclo de transmissão da febre amarela

No ciclo silvestre, o homem susceptível ao entrar na mata, é picado por mosquitos silvestres, que picaram anteriormente macacos e outros mamíferos infectados no período de viremia, que passa pelo período de incubação extrínseca. Desta forma o homem é inserido no ciclo de transmissão: **macaco** → **mosquito silvestre** → **homem** (Figura 1) (BRASIL, 2004).



Figura 2: *Haemagogus janthinomys* (VASCONCELOS, 2003)

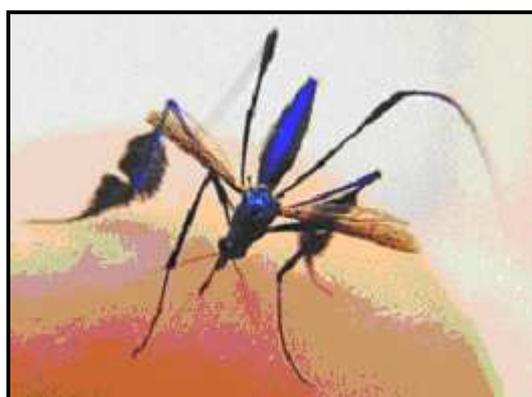


Figura 3: *Sabethes chloropterus* (UPPSALA, 2010)

1.6.4 Epidemiologia

A África é responsável por mais de 90% dos casos de febre amarela notificados anualmente à OMS, o que corresponde a cerca de 5000 casos anuais. Na América do Sul estima-se a ocorrência de 300 casos por ano (VASCONCELOS, 2003).

Nas Américas, a zona compreendida nessa delimitação, se inicia desde a Nicarágua até o sul da Bolívia (Figura 4). Na África, a zona enzoótica começa ao norte, no Senegal e se estende até Angola. Na direção leste-oeste, a doença tem se propagado nas Américas, do Atlântico até o Pacífico, e na África, desde o Atlântico até os afluentes do Nilo, na Etiópia. Em suas manifestações epizoóticas e epidêmicas, a febre amarela pode extrapolar os limites geográficos assinalados e estender-se para o norte ou para o sul, até onde possa ser levada pelo mosquito (BRASIL, 2004).



Figura 4: Áreas onde há risco de transmissão de febre amarela

No Brasil, a área epidemiológica de risco era, no início do século, quase que a totalidade do território nacional, mas com a erradicação da forma urbana da febre amarela foi possível delimitar 4 (quatro) áreas epidemiologicamente distintas no país (Figura 5): 1 - **Enzoótica ou endêmica** – corresponde à área onde o vírus amarelo circula entre os hospedeiros naturais (macacos, marsupiais etc) e os vetores silvestres, nessa área o homem é infectado acidentalmente. 2 - **Epizoótica ou de transição** – nesta área havia intensa circulação do vírus amarelo entre hospedeiros naturais. Com o processo de desmatamento o nicho ecológico alterou-se e nos últimos 30 anos a circulação viral evidenciou-se de forma esporádica. 3 - **indene de risco potencial** – corresponde a zonas contíguas às áreas de transição onde houve identificação recente da presença do vírus, têm ecossistemas

semelhantes e apresentam maior risco para circulação do vírus da febre amarela. Fazem parte dessa nova área: centro-norte do Espírito Santo, a partir do Vale do Canaã, em direção norte, área de influência da Bacia do Rio Doce; sul da Bahia, abaixo do Rio Jequitinhonha e o sul de Minas Gerais. Compreende 268 municípios e uma população de 4.777.348 habitantes. 4 - **Índene** – área onde não há circulação do vírus (BRASIL, 2004).

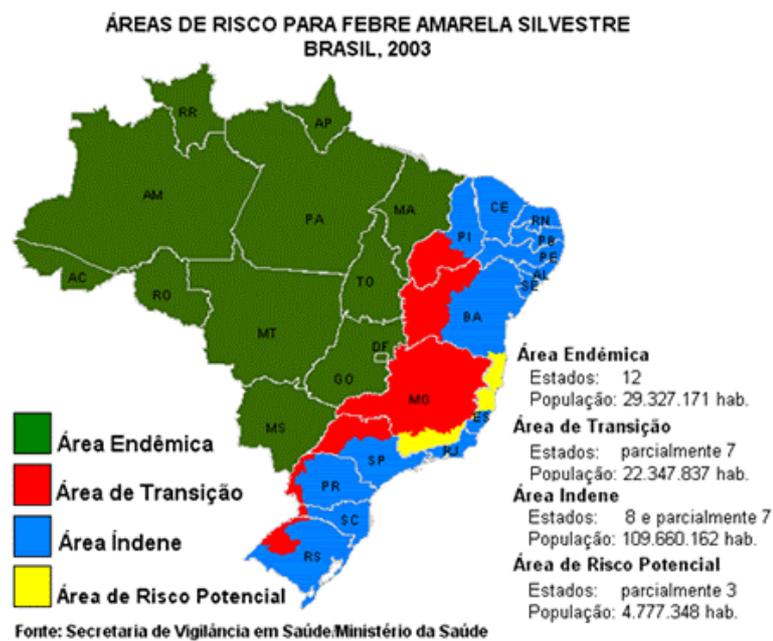


Figura 5: Áreas de risco para febre amarela silvestre

Atualmente o *Aedes aegypti* infesta 3952 municípios brasileiros e o *Aedes albopictus* 1533. A interação entre essas espécies é importante, pois se desenvolvem nos mesmos criadouros artificiais e são muito comuns em áreas de grande concentração humana (HONÓRIO; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 2003).

A questão da reurbanização tem sido muito discutida atualmente, principalmente com informações sobre a suscetibilidade do *Aedes aegypti* ao vírus da febre amarela, bem como a capacidade do *Aedes albopictus* se infectar com o vírus e servir de ligação entre o ciclo silvestre e o meio urbano. Por outro lado, o *Aedes aegypti* está distribuído em todos os estados do país, tanto dentro quanto fora das áreas endêmicas e epizoóticas (VASCONCELOS, 2003).

1.6.5 Patogenia e Patologia

Os aspectos patogênicos da infecção pelo vírus da febre amarela são conhecidos em parte e as informações acumuladas derivam de estudos em primatas não humanos, camundongos e achados histopatológicos de casos humanos fatais. A inoculação do vírus amarílico em camundongos desencadeia encefalite fatal. Em macacos determina tropismo semelhante ao observado no homem, isto é, viscerotropismo, sendo o fígado principal órgão alvo (VASCONCELOS, 2003).

Após a inoculação pelo mosquito, o vírus da febre amarela infecta e se replica em células dendríticas epidérmicas, fibroblastos e macrófagos nos linfonodos regionais. Produz uma pequena viremia e se espalha por todo o organismo atingindo o fígado, principal órgão-alvo da infecção além de baço, rins, medula óssea e músculos cardíacos esqueléticos. O espectro clínico da infecção por vírus da febre amarela varia de formas assintomáticas, formas leves ou moderadas com doença febril não específica e formas ictericas graves, em aproximadamente 20% das infecções. O quadro típico ocorre, após a incubação de 3 a 6 dias, com início abrupto de febre, calafrio, cefaléia intensa, mialgia generalizada, anorexia, náuseas e hemorragia gengival. Este período dura cerca de 3 (três) dias e é acompanhado de viremia. Pode seguir-se um período de remissão em que melhoram os sintomas (FIGUEIREDO, 2007).

Nas formas leves e moderadas da doença, a sintomatologia é indiferenciada, não característica, e se confunde com muitas doenças comuns nas áreas endêmicas, como malária, febre tifóide, mononucleose infecciosa etc. Na forma moderada, o paciente pode apresentar náuseas sem vômitos, bem como, mialgias e artralgias que não incomodam o paciente e não dificultam a sua locomoção. A febre só cede mediante o uso de antitérmicos. Acompanha este quadro pelo menos um dos sintomas clássicos da doença: hematêmese (vômito negro), icterícia ou oligúria/anúria. O período do estado sintomático é de 2 ou 3 dias e a recuperação completa. A Figura 6 mostra o percentual, das formas leve, moderada e grave dos casos de febre amarela (VASCONCELOS, 2003).

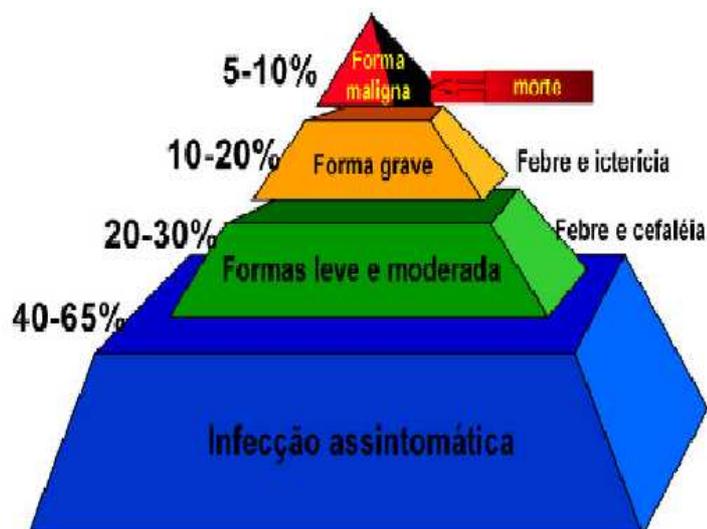


Figura 6: Distribuição das formas clínicas (VASCONCELOS, 2003).

1.6.6 Diagnóstico e tratamento

As formas leve e moderada da febre amarela são de difícil diagnóstico diferencial, pois podem ser confundidas com outras doenças infecciosas que atingem os sistemas respiratório, digestivo e urinário. Nas formas graves, com quadro clínico clássico ou fulminante, o diagnóstico diferencial é amplo, devendo ser feito com as doenças infecciosas que cursam com icterícia e/ou hemorragias. Na vigência de epidemias, quando outros casos já são conhecidos, a suspeita de febre amarela não é difícil, mas fora dessas situações, principalmente em áreas endêmicas, é importante uma abordagem sindrômica para melhorar a sensibilidade e oportunidade do reconhecimento e da vigilância dessas patologias. A história clínica, os antecedentes epidemiológicos e a realização precoce de alguns exames laboratoriais são fundamentais para esclarecimento do diagnóstico (BRASIL, 2004).

O diagnóstico definitivo da febre amarela pode ser feito utilizando-se métodos virológicos como: isolamento do vírus, identificação dos antígenos virais e RNA viral. Outra possibilidade é o diagnóstico através de métodos sorológicos como: dosagem de anticorpos específicos ou conversão sorológica (VASCONCELOS, 2003).

Não existe tratamento antiviral específico para febre amarela. O tratamento é apenas sintomático, com cuidadosa assistência ao paciente, que sob hospitalização, deve permanecer em repouso, com reposição de líquidos e das perdas sanguíneas quando indicado. O tratamento de suporte para os casos graves é fundamentado na sintomatologia apresentada e

deve visar à correção das alterações frequentemente encontradas em pacientes que apresentam disfunções hepática, renal, da coagulação e hemodinâmica, bem como os sintomas gerais mais exuberantes, como cefaléia, náuseas, vômitos, agitação e choque. Nos casos graves, a via endovenosa é a mais indicada para aplicação da medicação (BRASIL, 2004).

O tratamento medicamentoso deve-se voltar para o combate aos sintomas e os sinais manifestos da doença. A medicação a ser prescrita depende das manifestações clínicas, mas é comum o uso de antitérmicos e analgésicos nas doses usualmente indicadas para peso e idade. No primeiro sinal de insuficiência renal evidenciada por oligúria, é importante prescrever diuréticos. É contra indicado o uso de medicamentos que contenham em sua fórmula o ácido acetil-salicílico ou seus derivados, pois podem agravar os fenômenos hemorrágicos (VASCONCELOS, 2003).

1.6.7 Os Vetores Urbanos

O *Aedes aegypti* (Figura 7), vetor do ciclo urbano da febre amarela, é um mosquito tropical e subtropical encontrado em todo o mundo. Por sua associação com o homem é, um mosquito bastante domiciliado e urbano, encontrado nas cidades, vilas e povoados. A capacidade de resistência dos ovos de *Aedes aegypti* à dessecação é um sério obstáculo para sua erradicação. Esta qualidade permite que os ovos sejam transportados a grandes distâncias, tornando-se um importante meio para sua dispersão. A capacidade de dispersão do *Aedes aegypti*, pelo vôo, é pequena quando comparada a de outras espécies. A domesticidade é ressaltada pela presença de ambos os sexos dentro das residências (BRASIL, 2004).



Figura 7: *Aedes aegypti*

O primeiro registro da infestação de *Aedes albopictus* (Figura 8) no Brasil foi em 1986, no estado do Rio de Janeiro, em terreno da Universidade Federal Rural. Levou apenas um ano, para que o *Aedes albopictus*, fosse detectado em toda a região Sudeste. Essa espécie tem demonstrado potencial para ocupar áreas rurais e silvestres do Brasil. Embora, o *Aedes albopictus* esteja sob pressão nas áreas de controle do *Aedes aegypti*, não é a espécie-alvo nos programas de controle de dengue e febre amarela (SANTOS, 2003).

A competência vetora do *Aedes albopictus*, para transmissão da febre amarela, em laboratório, e o aumento da sua área de ocupação no país, já foi detectado em 14 estados brasileiros, apontando para o risco de maior número de casos da doença, uma vez que esta espécie transita nas áreas silvestres e urbanas (Figura 9). A possibilidade de o *Aedes albopictus* transportar o vírus do ambiente silvestre para o ambiente urbano é muito preocupante (SANTOS, 2003).



Figura 8: *Aedes albopictus*

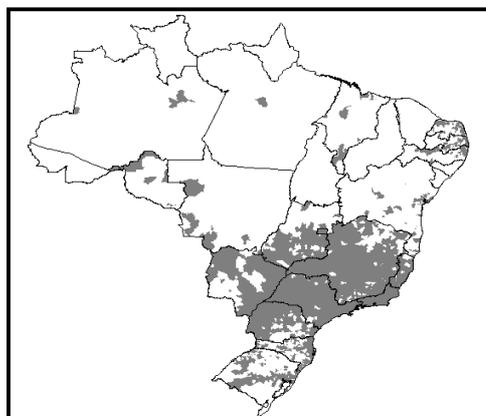


Figura 9: Distribuição do *Aedes albopictus* no Brasil (SANTOS, 2003).

Nas localidades infestadas deve-se fazer aplicação de inseticida, junto com as medidas de controle larvário. O trabalho de combate ao vetor, deve ser feito através de vigilância entomológica das localidades positivas e naquelas inicialmente positivas onde o vetor foi erradicado (BRASIL, 2004).

O conhecimento sobre os vetores é de extrema importância para o controle da doença. Considerando que o combate dos vetores silvestres é inviável, as ações devem ser focalizadas no vetor urbano, o *Aedes aegypti*.

1.6.8 Prevenção e Controle

O vetor urbano da febre amarela, o *Aedes aegypti*, encontra-se distribuído por todo o Brasil, o que indica a necessidade de um trabalho intenso para diminuir os índices de infestação nos grandes centros urbanos de todo o país (VASCONCELOS, 2003).

Além das políticas de controle de vetores, outra medida importante é o fomento à educação da população nas áreas de risco para a adoção de medidas de proteção individual, evitando a picada do mosquito.

A maneira mais eficaz de prevenção da febre amarela é a vacinação com a cepa 17D. Uma única dose de vacina protege por pelo menos dez anos, quando então é recomendada a re-vacinação. A cobertura vacinal contra a febre amarela varia de acordo com a área, muito boa nas áreas endêmicas e de transição e ruim na área indene da doença (VASCONCELOS, 2003).

A febre amarela faz parte das doenças de notificação compulsória, e como tal, qualquer caso suspeito deve ser comunicado a autoridade mais próxima. Este fato é uma ferramenta crucial para o melhor direcionamento das políticas públicas de controle da doença, como o combate aos vetores, educação e informação da população sob risco e campanhas de imunização.

1.7 A vacina contra febre amarela

Nos fins de 1927, na África ocidental, pesquisadores da Fundação Rockefeller fizeram uma descoberta muito importante: provaram que o macaco rhesus era suscetível à febre

amarela. A infecção foi transmitida do homem ao macaco e vice-versa, tanto por meio de injeção de sangue infectado, como pela picada do *Aedes aegypti* alimentado em doentes com febre amarela. Esta descoberta conseguiu trazer o vírus ao laboratório e estabelecer métodos que permitiram o estudo da doença como infecção experimental. Foi Theiler, em 1930, que realizou uma descoberta fundamental para o aprimoramento da vacina: demonstrou que o vírus é capaz de infectar camundongos albinos, quando inoculado diretamente no cérebro, sem produzir qualquer outra lesão em outro tecido que não o sistema nervoso central (FRANCO, 1969).

A informação obtida por Theiler libertou os laboratórios mais pobres do dispendioso investimento na compra de macacos indianos. Paralelamente, em 1936, Theiler, Loyd e Ricci cultivaram o vírus da febre amarela em tecido de embrião de camundongo. Era um vírus pantrópico proveniente de um caso benigno de febre amarela num africano chamado Asibi, em Kpeve, Gana. Foi na 17^a série de experiências, onde utilizaram a cepa Asibi, que acrescentaram letras aos números das experiências. A cultura do Asibi em tecido embrionário de camundongos foi chamada 17E. A cepa assim obtida era quase que destituída de viscerotropismo para o macaco e não apresentava neurotropismo para o camundongo, mas ela ainda produzia grave infecção sistêmica em macacos. Depois de várias passagens, desta cepa, em meio contendo embrião de camundongo, resolveram cultivá-lo em embrião de galinha completo, isto para impedir a contaminação acidental de outros vírus que pudessem ser patogênicos para o homem. Em seguida, o vírus foi transferido para um meio contendo polpa de embrião de galinha sem o sistema nervoso central, com a perspectiva de diminuição da atividade neurotrópica. A cultura prolongada neste meio diminuía as afinidades víscero- e neurotrópicas do vírus, pertencente à série de experiências 17D. Esta cepa produzia reações totalmente benignas, quando inoculadas subcutaneamente em rhesus, revelando-se imunizante eficaz contra material virulento. Por essas qualidades, foi chamado de “vírus camarada” (BENCHIMOL, 2001)

Em 1937, logo após o desenvolvimento da cepa 17D, por Theiler e Smith, nos Laboratórios da Fundação Rockefeller e a constatação de sua capacidade imunogênica para o homem, esta cepa foi trazida para o Brasil. A produção da vacina contra a febre amarela pelo Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, iniciou-se em março de 1937, e nesse mesmo ano foi usada pela primeira vez em maior escala durante o surto epidêmico de febre amarela ocorrido no município de Varginha/MG. Posteriormente, foi utilizada em programas de vacinação em outros estados brasileiros, com grande sucesso. A partir de então, a vacina

passou a ser aplicada na área endêmica, de forma sistemática como a melhor alternativa para o controle da febre amarela no país (BRASIL, 2004).

Todas as vacinas contra a febre amarela atuais derivam da cepa 17D. Durante a fase inicial de produção da vacina nos Estados Unidos e Brasil no período de 1937-1941, duas linhagens principais da 17D (17DD e 17D-204) foram utilizadas também para produção de vacinas. Em 1957 a OMS publicou “*Requirements for Yellow Fever Vaccine*” que unificou o lote de semente e procedimentos industriais. Novos lotes semente são testados para neurovirulência e viscerotropismo antes de serem utilizados para produção de vacinas (BARNETT, 2007).

Embora a forma silvestre da febre amarela não possa ser controlada, casos humanos podem ser evitados pelo uso da vacina. Também é importante prevenir o aparecimento de surtos de febre amarela urbana e para tanto, além do uso da vacina, deve-se combater a infestação por *Aedes aegypti*, com a eliminação de criadouros e uso de inseticidas. A vacina contra a febre amarela 17D (Figura 10), de vírus atenuado, é considerada altamente imunogênica (confere imunidade a cerca de 95% a 99% dos indivíduos vacinados), bem tolerada, e raramente associada a eventos adversos graves (Quadro 1). Ela está indicada para indivíduos com mais de 6 meses de idade (é contra-indicada para crianças menores de 6 meses de idade devido ao maior risco associado à encefalite pós-vacinal nesta faixa etária), sendo ministrada em dose única e com reforço a cada dez anos. Dados recentes do Ministério da Saúde apontam para a transmissão do vírus vacinal via leite materno; por esta razão a vacinação é contra indicada para mulheres em fase de amamentação (CDC, 2010). Esta vacina é rotineiramente usada pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI), nas zonas endêmicas, de transição e de risco potencial, sendo obrigatória a todas as pessoas que se deslocam à zona endêmica (FIGUEIREDO, 2007).

Quadro 1: Eventos adversos pós-vacinação (EAPV) contra febre amarela.

Evento adverso	Descrição	Tempo entre vacinação e EAPV	Frequência	Conduta	Observação
Manifestações locais	Dor, eritema e endureção por 1 a 2 dias	1 – 2 dias	~4%	Notificar abscessos, lesões extensas ou com limitação de movimentos, e casos não graves muito frequentes; não contra-indica revacinação	
Manifestações gerais	Febre, mialgia e cefaléia Sintomas leves por 1 – 2 dias	A partir do 3º dia	<4% (menor em revacinados)	Notificar/investigar aglomerados de casos; não contra-indica revacinação	Buscar casos em não vacinados
Hipersensibilidade	Urticária, sibilos, laringoespasmos, edema de lábios, hipotensão, choque	Menos de 2 horas	2 por milhão	Realização de diagnóstico diferencial	Revacinação contra indicada
Encefalite	Febre, meningismo, convulsões, torpor	7 – 21 dias	1 em 22 milhões	Notificar e investigar também outras síndromes neurológicas graves; diagnóstico diferencial	Revacinação contra-indicada
Doença viscerotrópica aguda	Síndrome íctero-hemorrágica	Primeiros 10 dias	<1 para 450.000 doses	Notificação imediata e coleta urgente de espécimes	Revacinação contra-indicada

Fonte: BRASIL,2008.

Segundo o Manual de Vigilância Epidemiológica de Eventos Adversos pós-vacinação do Ministério da Saúde (Brasil, 2008), desde 2003 uma nova e grave complicação tem sido descrita envolvendo vacinas contra febre amarela de diferentes fabricantes e cepas: a doença viscerotrópica aguda. O quadro clínico se assemelha à febre amarela selvagem com início na primeira semana após a vacinação e inclui febre, astenia, icterícia, oligúria, instabilidade cardiovascular, hemorragia e necrose hepática (Galler et al., 2001; CDC, 2010; Kitchener, 2004). Em óbitos ocorridos no Brasil, os dados clínicos e anátomo-patológicos indicaram tratar-se de infecção pelo vírus vacinal. Como não houve alteração do genoma viral a conclusão foi de que a complicação resultou de suscetibilidade individual. As estimativas de risco aproximadas colocam como pior cenário a frequência de 1 óbito para 450.000 doses aplicadas.



Figura 10: Vacina comercial contra a febre amarela.

1.7.1 Controle de Qualidade da Vacina Contra Febre Amarela

A vacina contra febre amarela, como os demais imunobiológicos destinados ao PNI, é submetida à análise laboratorial e documental antes da liberação dos lotes para uso humano.

Os ensaios laboratoriais realizados nos lotes de vacina contra febre amarela são demonstrados no Quadro 2 e incluem desde a determinação do teor de umidade residual, até a avaliação da segurança e potência. A análise documental (protocolo resumido de produção e controle) consiste da verificação dos procedimentos de produção e do controle de qualidade das diversas etapas de produção, lote final e das matérias-primas. Essa análise, além de ser um requisito para a liberação dos lotes, permite ao laboratório controlador avaliar a consistência

de produção, através, por exemplo, do acompanhamento dos valores de potência utilizando gráficos de controle.

O gráfico de controle consiste da representação de dados (de categoria atribuída ou variável) ao longo do tempo. Essa ferramenta permite avaliar o comportamento de um determinado processo e fundamentar ações preventivas e/ou corretivas, quando necessário. O programa SPC Explorer RT é recomendado pela OPAS para o acompanhamento de materiais de referência para a validação de ensaios, na avaliação da consistência de produção de fabricantes de imunobiológicos e na comparação entre resultados dos fabricantes e do órgão fiscalizador.

Quadro 2 : Ensaios analíticos realizados no INCQS para a vacina contra febre amarela

Departamento de Imunologia	Departamento de Microbiologia	Departamento de Química	Departamento de Farmacologia e Toxicologia
Análise do Protocolo	Esterilidade Bacteriana e fúngica	Teor de Umidade Residual	Endotoxina bacteriana
Potência			
Termoestabilidade			
Determinação de Ovalbumina			
Valores de Referência:			
Potência >=10 ^{3,0} UFP/dose	Ausência de bactérias e fungos contaminantes	< ou = 3,0g %	< ou = 10EU/mL
Termoestabilidade Perda < ou = 1,0 log 10 e título > ou = 10 ^{3,0} UFP/dose			
Determinação de ovoalbumina <ou=5 µg/dose			

UFP: Unidades Formadoras de "Plaque"

Farmacopéia Brasileira, Fascículo 3, 4ª Edição, Parte II-2001

É importante destacar que todos os testes citados no Quadro 2, relativos ao controle da qualidade da vacina contra febre amarela são realizados segundo a 4ª Edição da Farmacopéia Brasileira e que desde 2002, o INCQS atende ao PNI através de uma lógica de análise por aleatoriedade, isto é, para cada 5 lotes ingressados no Instituto, independente de sua apresentação (5, 10 ou 50 doses), somente 1 é aleatoriamente selecionado e conseqüentemente submetido aos ensaios laboratoriais citados acima. A política de aleatoriedade prevê ainda que 100% dos lotes ingressados no INCQS sejam objeto de análise documental, *i.e.* a análise de protocolo resumido de produção e controle ocorre para todos os lotes destinados ao PNI. A decisão pela política de aleatoriedade para o controle da qualidade deste e de outros produtos imunobiológicos está detalhada na Portaria do INCQS N°031/2002, sendo fruto de consenso alcançado pela ANVISA, FUNASA e INCQS.

1.7.2 Determinação da Potência e Termoestabilidade da Vacina contra Febre Amarela

A determinação da potência da vacina contra febre amarela é realizada a partir da avaliação de três frascos, de um mesmo lote, coletados aleatoriamente do total recebido no Laboratório de Vacinas Virais do Departamento de Imunologia do INCQS e submetidos ao método de unidades formadoras de “plaque”¹, em paralelo com a vacina de referência. Para tal, deve-se diluir a vacina (teste e referência) aplicando-se fator 4 e inocular cada diluição em, pelo menos, três orifícios da placa de seis orifícios contendo monocamada de células Vero² previamente semeadas. A concentração da linhagem celular pode variar de 150.000 a 300.000 células por mL, conforme o dia de sua utilização. Após adsorção por período de 90 minutos à temperatura de 36°C, em ambiente de CO₂ a 5%, os inóculos são retirados e um meio de cultura, contendo agarose ou carboximetilcelulose em concentração adequada, é adicionado. As células são incubadas por cinco a sete dias, à temperatura de 36°C, em ambiente de CO₂ a 5%. Após o período de incubação, retira-se o meio de crescimento, e precede-se a fixação das células com formaldeído e coloração com um corante vital.

A potência da vacina é calculada pela média do número de plaques de, pelo menos, duas diluições e o resultado, expresso em log₁₀ UFP/dose. Para a determinação ser considerada válida, é necessário que: (a) o controle de cultura de células apresente

¹ **Plaque** – Foco localizado de células infectadas por vírus, apresentando efeito citopático, evidenciado por uma área circular incolor frente a um fundo corado quando da coloração da monocamada por um corante vital.

² **Célula Vero** – Célula de linhagem contínua originária de rim de macaco verde africano.

monocamada inalterada; (b) a variação de potência entre as três amostras da vacina não seja maior que 0,5 log₁₀ UFP; (c) a potência da vacina referência não varie mais que 0,5 log₁₀ UFP do seu título médio; e (d) o número de UFP seja decrescente em relação às diluições crescentes.

A potência em UFP/dose tem que ser equivalente a 1000 DL50 em camundongos. Caso a amostra não cumpra com os requisitos, a determinação deve ser repetida. Neste caso, a potência da vacina é expressa pela média geométrica das duas determinações realizadas.

A termoestabilidade da vacina contra febre amarela é avaliada em paralelo à determinação de potência, sendo que para este teste os três frascos de vacina devem ser incubados, por 14 dias a 36°C e analisados conforme descrito acima para a determinação de potência. Como resultado satisfatório para o teste de termoestabilidade, espera-se que a vacina teste não perca mais que 1 log₁₀ UFP em relação ao título determinado na amostra conservada em condições adequadas de temperatura. Além disso, não deve apresentar título inferior ao especificado para a potência do produto (Farmacopéia Brasileira, Fascículo 3, 4ª Edição, Parte II-2001).

1.8 Justificativa

No início da década de 1980, o Ministério da Saúde, através da Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde (SNABS), responsável pelo PNI, estabeleceu o Programa de Qualidade em Imunobiológicos, sob a responsabilidade de um grupo de trabalho (GT), que iniciou algumas atividades relacionadas à Vigilância Sanitária de soros hiperimunes e vacinas que vinham sendo utilizados nos programas oficiais brasileiros. As atividades incluíam: controle de qualidade lote a lote, inspeções nos produtores nacionais, solicitação de consultorias internacionais de especialistas e controle da qualidade externo dos imunobiológicos produzidos no país.

Na mesma época, requisitou-se ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), que adequasse uma das áreas construídas para implantar o Programa de Controle de Qualidade, lote a lote, dos imunobiológicos utilizados nos programas oficiais de imunização do Ministério da Saúde. Desde então, cada lote de imunobiológico utilizado pelo PNI, seja de produção nacional ou um produto importado, é necessariamente analisado pelo INCQS.

A experiência adquirida ao longo destes quase 30 anos de controle da qualidade de soros hiperimunes e vacinas nos permite perceber uma melhoria nos processos que, conseqüentemente, vem garantindo que somente produtos que demonstre requisitos mínimos de qualidade e conformidade sejam aplicados na população (Netto et al, 2010; Gemal & Leal, 2005).

Tal experiência nos leva igualmente a identificar desafios, como a busca por novas metodologias de controle da qualidade com a finalidade de atender a um universo cada vez maior de produtos e tecnologias inovadoras, além é claro, da constante busca pelo avanço do processo de controle da qualidade, tornando-o mais ágil e preciso.

É neste contexto, que o presente trabalho pretende contribuir, avaliando o desempenho do processo de controle da qualidade de vacinas avaliadas pelo INCQS, mais especificamente vacinas contra febre amarela; e buscando propor a utilização de ferramentas que se mostrem úteis para a melhoria desse processo, a partir da análise comparativa dos resultados obtidos para vacinas nacionais e importadas, e da consistência de produção e detecção de tendências sistemáticas relacionadas ao controle da qualidade e produção de vacinas contra febre amarela usadas pelo PNI na última década.

Por fim, vale ainda ressaltar que a relevância do teste de potência para vacina contra febre amarela já foi demonstrada e é aceita devido a sua satisfatória correlação com o método *in vivo* de DL50 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1988). No entanto, embora os métodos farmacopéicos sejam aceitos sem a necessidade de uma re-validação, acreditamos ser necessária a demonstração sistemática de que os métodos biológicos utilizados para controle da qualidade de vacinas e soros hiperimunes apresentam precisão e exatidão suficientes para atingir níveis de detecção satisfatórios (NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES, 1977; FRAZIER, 1990). Assim, o presente estudo teve ainda como proposta a validação³ retrospectiva do teste de potência da vacina em questão, através da demonstração de sua confiabilidade (variabilidade e precisão) e do acompanhamento do desempenho da vacina de referência usada nos testes de potência e termoestabilidade.

³ **Validação é o processo pelo qual a confiabilidade e a relevância de um método de ensaio são avaliadas com o propósito de suportar um uso específico.**

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar o desempenho do processo de controle da qualidade das vacinas contra febre amarela, analisadas pelo INCQS no período de 2000 a 2008.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do presente estudo são:

- a. analisar, através do Sistema de Gerenciamento de Amostra (SGA)⁴, todos os lotes de vacina contra febre amarela recebidas pelo INCQS no período de 2000 até 2008, comparando os resultados obtidos nos ensaios analíticos (esterilidade bacteriana e fúngica, endotoxina bacteriana, teor de umidade residual, teor de ovoalbumina, potência e termoestabilidade) entre as amostras produzidas no Brasil (Fabricante A) e aquelas importadas (Fabricante B);
- b. analisar os valores resultantes dos testes de potência e termoestabilidade, obtidos no Fabricante A, através da utilização de gráficos de controle (utilizando o programa SPC⁵ Explorer RT), a fim de avaliar criticamente sua consistência de produção;
- c. comparar os valores resultantes dos testes de potência e termoestabilidade, obtidos no Fabricante A com os dados do INCQS, e analisar criticamente as diferenças, através da utilização do programa SPC Explorer RT;
- d. avaliar, retrospectivamente, o desempenho da vacina de referência (lote 003) usada nos testes de potência e termoestabilidade, através da utilização do programa SPC Explorer RT;
- e. validar, retrospectivamente, o ensaio de potência da vacina contra febre amarela, através da demonstração de sua confiabilidade (variabilidade e precisão).

⁴ O Sistema de Gerenciamento de Amostra surgiu no ano de 1999, a partir da necessidade do INCQS de informatizar o fluxo operacional de análise e possuir uma forma de gerenciar as atividades de controle da qualidade de produtos sujeitos à Vigilância Sanitária. Este sistema permite o acompanhamento das análises de produtos, desde a sua chegada ao Instituto até a liberação do laudo de análise.

⁵ Este programa da Quality America foi recomendado pela OPAS no ano de 2008, por sugestão do INCQS, para o acompanhamento de materiais de referência visando a validação de ensaios, para a avaliação de consistência de produção de fabricantes de imunobiológicos e para a comparação entre os resultados dos fabricantes e do órgão fiscalizador.

3. METODOLOGIA

3.1 Coleta dos dados gerais das amostras

Através do SGA, cujo sistema permite o acompanhamento das análises, foram realizadas consultas referentes a amostras de vacina contra febre amarela avaliadas pelos Departamentos de Imunologia, Microbiologia, Química, Farmacologia e Toxicologia do INCQS entre o período de janeiro de 2000 a dezembro de 2008. Estes produtos, uma vez ingressados no INCQS, foram avaliados quanto a: (i.) análise de protocolo resumido de produção e controle, (ii.) teste de potência, (iii.) teste de termoestabilidade, (iv.) determinação de ovoalbumina residual, (v.) esterilidade bacteriana e fúngica, (vi.) teor de umidade residual e (vii.) teste de endotoxina bacteriana.

Todos os testes citados acima relativos ao controle da qualidade da vacina contra febre amarela foram realizados segundo a 4ª Edição da Farmacopéia Brasileira. As consultas ao SGA buscaram levantar as seguintes informações:

1. Total de lotes⁶ analisados anualmente
2. Total de doses analisadas anualmente
3. Procedência dos lotes analisados
4. Apresentação dos lotes analisados
5. Resultados das análises laboratoriais
 - 5.a. Resultados satisfatórias
 - 5.b. Resultados insatisfatórias
 - 5.c. Proporção do número de lotes e doses insatisfatórios
 - 5.c. Motivo(s) da insatisfatoriedade.

Enfim, uma ampla variedade de dados, que uma vez levantados no SGA (através da busca pela palavra-chave “febre amarela”) foram transferidos para planilhas de Microsoft Excel® e demonstrados em gráficos e tabelas, permitindo aferir a qualidade da vacina contra febre amarela, baseando-se no processo industrial e em conformidade com as Boas Práticas de Fabricação.

⁶ Cada lote que ingressa no INCQS é considerado uma amostra nova no SGA. O número de doses individuais que cada lote contém depende de fatores como sua apresentação (5, 10 ou 50 doses) e a capacidade de produção de cada fabricante.

3.2 Levantamento dos resultados dos fabricantes e do INCQS quanto aos testes de potência e termoestabilidade

Realizamos, junto à equipe do Laboratório de Vacinas Virais do Departamento de Imunologia do INCQS, levantamento sobre os resultados obtidos pelos fabricantes para os testes de potência e termoestabilidade, através de consulta ao protocolo resumido de produção e controle. Esses dados foram utilizados para analisar criticamente a consistência de produção das vacinas contra febre amarela e ainda, para comparar os valores resultantes dos testes de potência e termoestabilidade com os valores obtidos no INCQS (através do uso do Programa SPC Explorer RT).

Como desde 2002, o INCQS atende ao PNI através de uma lógica de análise por aleatoriedade (*i.e.* para cada 5 lotes de vacina contra febre amarela ingressados no Instituto, somente 1 é selecionado para realização dos ensaios laboratoriais citados no Quadro 2), somente os lotes aleatoriamente selecionados foram usados para a confecção dos gráficos de controle.

3.3 Confeção de gráficos de controle

O acompanhamento do processo de controle da qualidade da vacina contra febre amarela também foi realizado a partir da análise de três diferentes gráficos de controle. Esses gráficos de controle foram realizados utilizando os seguintes dados: a) valores de potência (ou de termoestabilidade) fornecidos pelo fabricante no protocolo resumido de produção e controle; b) valores de potência (ou de termoestabilidade) obtidos nos testes realizados INCQS; c) diferenças absolutas dos valores fornecidos pelo fabricante e os obtidos pelo INCQS.

A avaliação do processo de controle de potência no INCQS foi realizada através do acompanhamento da vacina de referência de febre amarela utilizando gráficos de controle.

A partir da coleta dos dados, os gráficos foram confeccionados como definido pela OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1997). Os eixos dos gráficos foram formados pelo tempo (abscissa) e pelo resultado do teste de potência (ordenada). As linhas horizontais do gráfico consistiram da média, dos limites superiores e inferiores, calculados a partir da média adicionada de 2 desvios-padrão (DP) e média mais 3 DP. Os limites inferiores foram calculados a partir da média subtraída de 2 DP e 3 DP. As médias, os desvios-padrão e,

conseqüentemente os limites foram calculados com os primeiros 20 valores mensurados a cada ano. Os limites de 2 DP são considerados limites de alerta e os de 3 DP, limites de rejeição do ensaio. Depois de adicionados aos gráficos, os valores foram imediatamente adicionados ao gráfico e submetidos aos testes de *performance*.

Tanto a confecção dos gráficos como os testes de *performance*, tratados adiante, foram realizados utilizando o programa SPC Explorer RT, versão 5.21 (Quality America Inc.).

O programa SPC Explorer RT, versão 5.21, realiza os testes de *performance*, destacando os valores que atendem às características previamente especificadas pelo operador.

Os testes de *performance* realizados nos gráficos de controle dos resultados de potência e termoestabilidade, obtidos pelo fabricante e pelo INCQS, e da diferença entre os dois laboratórios, verificaram a ocorrência de:

- a) um valor além dos limites de confiança superior ou inferior (3DP);
- b) seis valores consecutivos ascendentes ou descendentes.

Já os testes de *performance* nos gráficos de controle dos resultados da vacina de referência de febre amarela no INCQS verificaram a ocorrência de:

- a) um valor além dos limites de confiança superior ou inferior (3DP);
- b) seis valores consecutivos ascendentes ou descendentes;
- c) dois dentre três valores além dos limites de alerta superior ou inferior (2DP);
- d) nove valores consecutivos do mesmo lado da linha da média.

Sempre quando um dos critérios descritos nas alíneas *b*, *c* ou *d* foi atendido, uma análise crítica do teste foi realizada de modo a verificar possíveis tendências nos resultados no processo. Nos casos em que o resultado obtido para a vacina de referência encontrou-se além dos limites de controle (3DP), o teste foi considerado inválido e repetido.

3.4 Validação de ensaios analíticos

Foi realizado um estudo retrospectivo visando validar o ensaio através da demonstração de sua confiabilidade (variabilidade e precisão), utilizando os resultados da vacina de referência contra febre amarela, lote 003, obtidos em 48 ensaios independentes, nos quais foram testados 311 lotes da vacina comercial, realizados no INCQS no período de 2007 a 2009.

A precisão de um método pode ser avaliada de diferentes maneiras: análise da repetitividade (também conhecida como precisão intra-corrída), da precisão intermediária (também conhecida como precisão inter- corrída) e da reprodutibilidade (ou precisão inter-laboratorial) e pode ser expressa como coeficiente de variação percentual (CV%).

No nosso estudo foram calculadas a exatidão⁷, a repetitividade, e a precisão⁸ intermediária. A precisão intermediária foi analisada tendo como variável os diferentes dias de ensaio (N=48) e os diferentes analistas envolvidos na realização dos ensaios. No período estudado, dois analistas foram envolvidos na realização dos ensaios, i.e. 34 ensaios realizados pelo analista 1 e 14 pelo analista 2.

A exatidão foi avaliada através do cálculo do percentual de recuperação calculado pela subtração da média geral obtida em todos os ensaios e o título declarado do lote 003 de referência ($10^{4,91}$ UFP/dose). Este valor foi estabelecido no ano de 2000, através de estudo colaborativo entre INCQS, Bio-Manguinhos, “Agence Francaise de Securite Sanitaire des Produits de Sante” (AFSSAPS) e Instituto Nacional de Vigilância de Medicamentos e Alimentos (INVIMA) da Colômbia.

A repetitividade foi avaliada calculando-se a variação entre os resultados da vacina de referência contra febre amarela, ensaiada com duas diluições (1/640 e 1/2560) com seis replicatas cada, de forma independente a cada análise de potência.

⁷A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em questão em relação a um valor verdadeiro.

⁸A precisão, por sua vez, é avaliada pela proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em questão em relação a um valor verdadeiro.

Para cada amostra testada foi avaliado o CV% geométrico utilizando planilhas do Microsoft Excel®.

A precisão total foi calculada segundo Klein et al. 1999, a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Precisão total} = 100 \cdot \left(e^{\sqrt{\hat{\sigma}_{\text{Inter}}^2 + \hat{\sigma}_{\text{Intra}}^2}} - 1 \right) \%$$

Onde:

$\hat{\sigma}_{\text{Inter}}^2$ = Variância inter-ensaios

$\hat{\sigma}_{\text{Intra}}^2$ = Variância intra-ensaios

4 RESULTADOS/DISCUSSÃO

4.1 Total de lotes de febre amarela

Conforme observamos na Figura 11, no período compreendido entre o mês de janeiro de 2000 e dezembro de 2008, ingressaram no INCQS, 1031 lotes de vacinas contra febre amarela, correspondendo a aproximadamente 285 milhões de doses. Pode-se observar que existe uma variação no número de lotes/doses; enquanto mais de 150 lotes foram analisados por ano entre 2003 e 2005, observa-se que somente 29 lotes ingressaram para análise no ano de 2001. Esta variação no quantitativo de lotes/doses por ano pode ser explicada por diferentes fatores, entre eles: a forma de apresentação do produto (5, 10 ou 50 doses), o tamanho do lote (que por sua vez depende da capacidade de produção de cada fabricante) e pelas estratégias políticas relacionadas a ações preventivas por parte do Ministério da Saúde.

Neste sentido, cabe ressaltar que nos anos de 2003, 2004 e 2005, houve um plano de intensificação de ações preventivas e de vigilância da febre amarela. No final de 2007, quando houve campanhas de vacinação da população brasileira, parte dos lotes inicialmente destinados à exportação foram utilizados em nível nacional, devido à escassez do produto e à doação deste produto para alguns países da América do Sul.

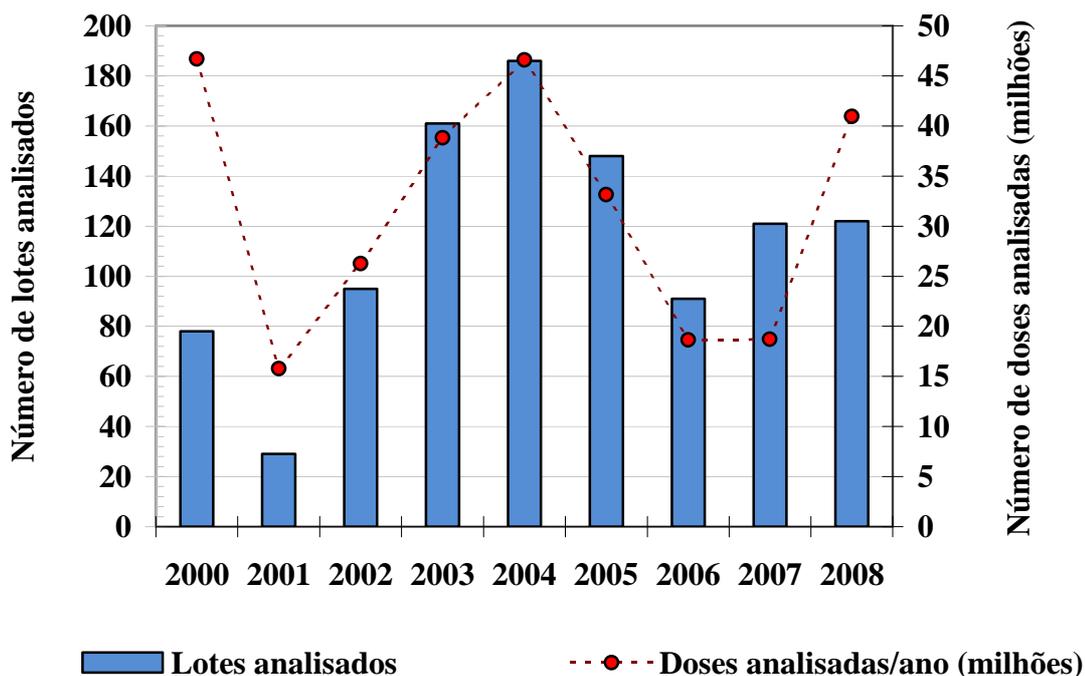


Figura 11: Quantitativo de lotes de vacina contra febre amarela analisados pelo INCQS (2000 – 2008)

De acordo com o Ministério da Saúde do governo brasileiro, as prioridades de produção no âmbito nacional e aquisição de imunobiológicos são para atendimento às necessidades epidemiológicas nacionais. A proporção entre os lotes recebidos pelo INCQS no período entre 2000 e 2008, com relação as diferentes apresentações da vacina contra febre amarela (5, 10 ou 50 doses), está demonstrada na Figura 12.

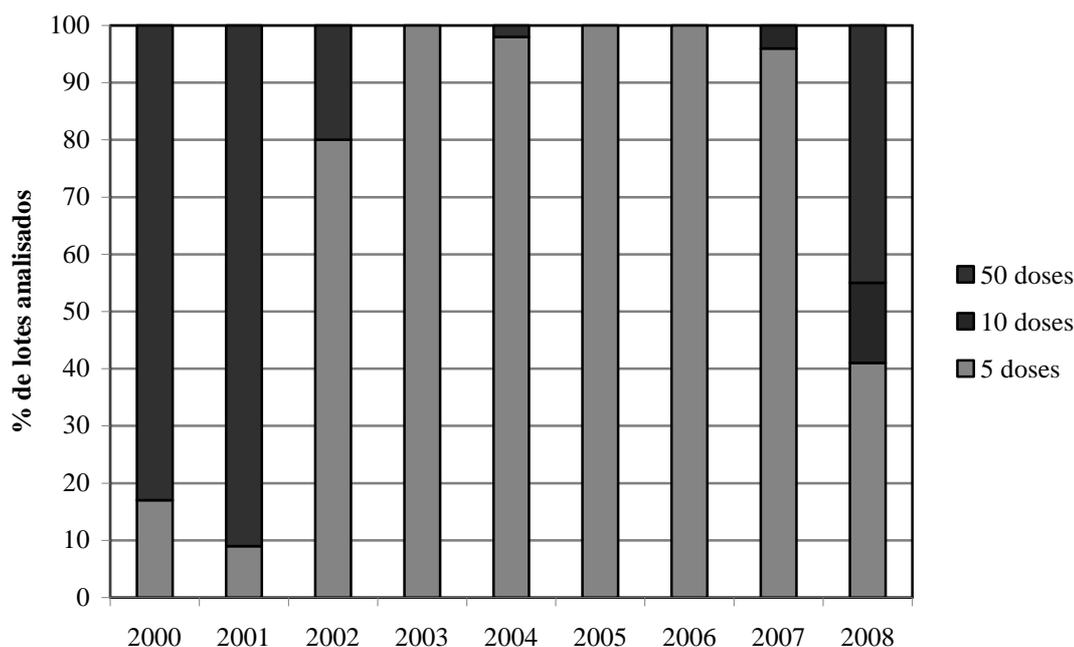


Figura 12: Relação entre apresentações de 5, 10 e 50 doses de vacina contra febre amarela

Observa-se que nos primeiros anos de estudo havia uma predominância pela apresentação de 50 doses. Este quadro se alterou nos anos de 2002 a 2007, quando o PNI passou a empregar predominantemente vacinas de 5 doses, tendo inclusive nos anos de 2003, 2005 e 2006 usado exclusivamente vacinas com esta apresentação. Em 2008, observa-se um novo aumento da utilização de vacinas com 50 doses. O emprego de vacinas contra febre amarela com apresentação de 10 doses ocorreu em menor escala, e unicamente nos anos de 2007 e 2008.

4.2 Insatisfatoriedade dos lotes de febre amarela

Como pode ser observado na Tabela 1, nos anos de 2000, 2002, 2006 e 2008, foram encontrados resultados insatisfatórios durante o controle da qualidade para vacina contra febre amarela pelo INCQS. Somando os anos, detectamos desvios de qualidade e conformidade em 5 lotes (2 lotes em 2000 e 1 lote respectivamente em 2002, 2006 e 2008) de vacinas provenientes do fabricante A.

O fabricante A apresentou nos anos de 2000 e 2002 insatisfatoriedade de 1 lote/ano, devido ao resultado obtido com o ensaio de teor de umidade residual. Já nos anos de 2000,

2006 e 2008, os lotes foram insatisfatórios (1 lote por ano) no ensaio de Esterilidade Bacteriana e Fúngica. Dentre os lotes reprovados pelo INCQS, quatro eram de apresentação de 5 doses e apenas um de 50 doses. Ao todo, aproximadamente 1.730.000 doses de vacinas contra febre amarela foram reprovados no período estudado, sendo conseqüentemente descartadas pelo fabricante A.

Tabela 1: Resultados insatisfatórios de lotes de vacinas contra febre amarela analisadas pelo INCQS entre 2000 e 2008

Ano	Apresentação	Motivo da Insatisfatoriedade	Identificação do microorganismo
2000 (2 lotes)	50 doses/ca. 901.000 doses	Teor de umidade residual	-
	5 doses/ca. 210.000 doses	Esterilidade bacteriana e fúngica	<i>Enterobacter cloacae</i>
2002 (1 lote)	5 doses/ca. 204.000 doses	Teor de umidade residual	-
2006 (1 lote)	5 doses/ca. 209.000 doses	Esterilidade bacteriana e fúngica	<i>Sphingomonas</i> sp. Isoladas e caracterizadas por metodologia fenotípica e genotípica
2008 (1 lote)	5 doses/ca. 208.000 doses	Esterilidade bacteriana e fúngica	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>

4.3 Distribuição das amostras analisadas no INCQS por fabricante

Observando-se a Figura 13, verificamos um histórico do número de lotes analisados no período de 2000 a 2008. Observamos que o fabricante A assume em todos os anos o fornecimento da vacina contra febre amarela, atendendo à demanda gerada pelo quadro epidemiológico do país. Entretanto, pode-se verificar que somente nos anos 2003 e 2007, o Programa Nacional de Imunizações do Ministério da Saúde não importou a vacina contra febre amarela, diferente dos demais anos, quando foi necessária a importação para atendimento das necessidades epidemiológicas nacionais, principalmente no ano de 2008.

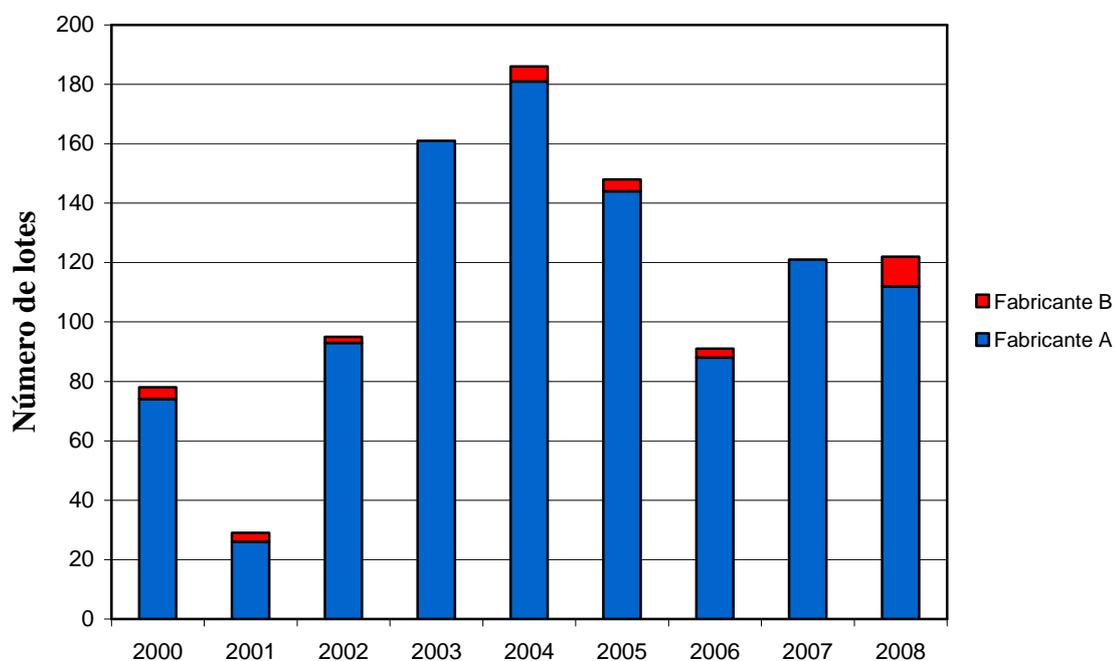


Figura 13: Distribuição dos lotes analisados no INCQS por fabricante (2000 – 2008)

4.4 Avaliação da consistência de produção das vacinas contra febre amarela do fabricante A através da análise dos gráficos de controles de processo

Os resultados mostrados nos gráficos de controle correspondem somente aos lotes do fabricante A que foram submetidos aos ensaios laboratoriais no INCQS entre os anos de 2005 e 2008. Todos os lotes de vacina contra febre amarela foram avaliados quanto as suas especificações, através da análise da documentação fornecida pelo fabricante (Protocolo Resumido de Produção e Controle) e da análise laboratorial realizada pelo INCQS. Conforme mencionado anteriormente, os dados referentes às amostras que entraram na aleatoriedade, não foram incluídos na elaboração dos gráficos de controle.

Como mencionado anteriormente, a confecção de gráficos de controle é uma ferramenta utilizada para identificar causas especiais de variação num determinado processo. A identificação desta variação é possível através da determinação de parâmetros que nos informem se o processo está ocorrendo dentro dos limites esperados ou se existe algum fator interferindo nos resultados.

Nos gráficos apresentados, podemos observar variações naturais do processo, também denominadas causas comuns de variação, que estarão presentes mesmo que todas as operações sejam executadas com métodos padronizados. Quando ocorrem somente causas comuns de variação, todos os valores encontram-se dentro dos limites de controle. Neste caso, dizemos que apesar da variabilidade, o processo está sob controle estatístico. Nos casos em que um valor se encontra fora dos limites de controle, dizemos que causas especiais de variação estão interferindo no processo.

Em 2005, dois valores de potência fornecidos pelo fabricante, dentre os 127 lotes analisados encontravam-se abaixo do limite inferior de controle (3 desvios-padrão) (Figura 14 a), representando um percentual de 1,57%. Na Figura 14 b, que mostra os valores de potência obtidos pelo INCQS para os mesmos lotes descritos na Figura 14 a, não foram encontrados valores fora dos limites de controle. A Figura 14 c, onde constam as diferenças absolutas para os valores de potência dos laboratórios de controle do INCQS e do fabricante, também não apresenta valores fora dos limites.

Nos gráficos da Figura 14 é ainda possível observar que a diferença entre o limite superior de controle (LSC) e o limite inferior de controle (LIC) foi de 0,731 para o fabricante

A (Figura 14 a). Já na Figura 14 b foi possível observar que essa mesma diferença entre os limites foi aproximadamente a metade (0,318) para os valores obtidos pelo INCQS. Dessa maneira, pode-se concluir que a variação do processo de controle de potência no laboratório de controle do fabricante em questão é maior que no INCQS.

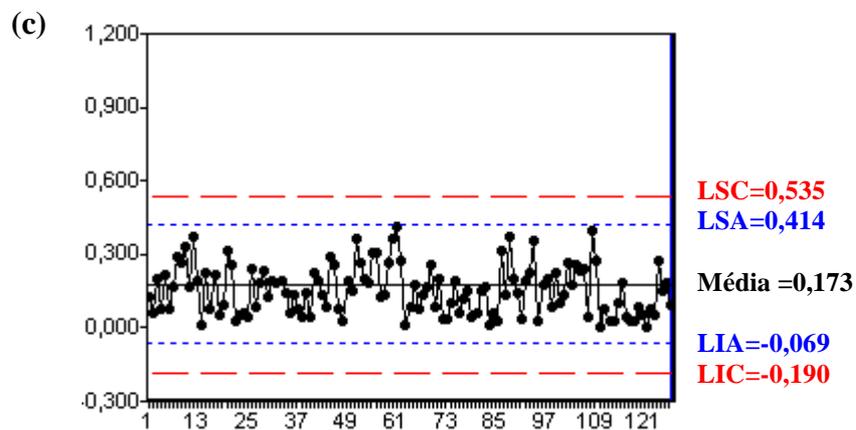
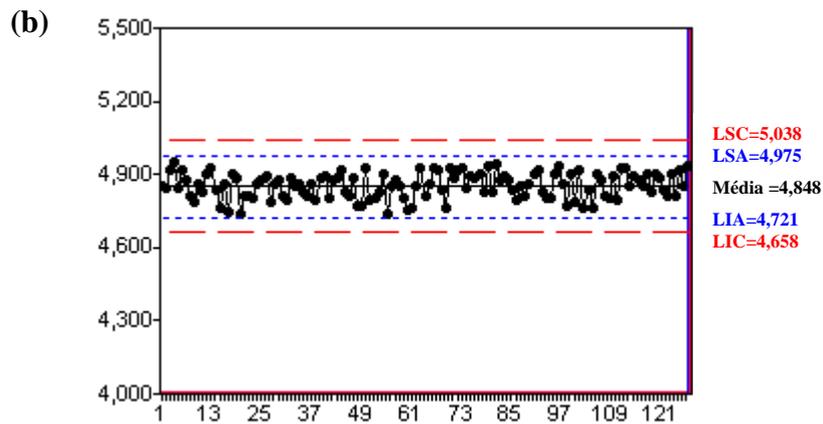
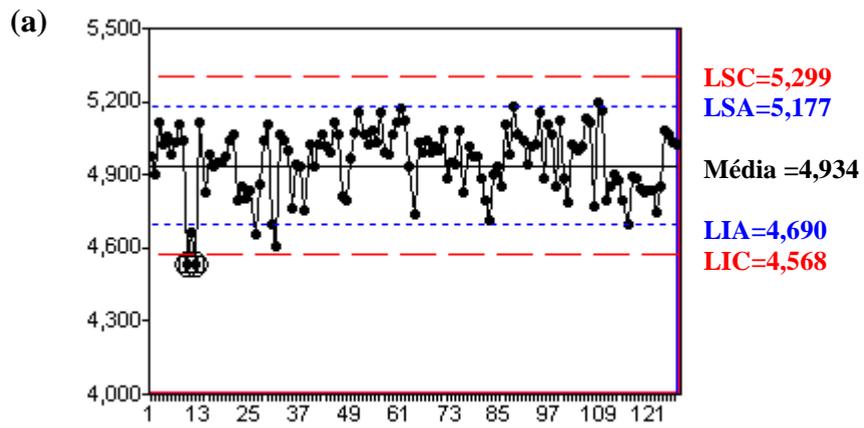


Figura 14: Resultados de potência do fabricante A (a), do INCQS (b) e diferença (c) dos resultados dos lotes analisados em 2005
 LSC – limite superior de controle; LSA – limite superior de alerta; LIA – limite inferior de alerta; LIC – limite inferior de controle

Em 2006, foram analisados 57 lotes de vacina contra febre amarela. Dentre eles, 8 valores de potência (14%) encontravam-se além dos limites de controle nos gráficos que representavam os valores fornecidos pelo fabricante (Figura 15 a).

Nas Figuras 15 b e 15 c, apenas 1 valor encontrava-se além dos limites de controle, o que representa um percentual de 1,75%. A diferença entre os LSC e o LIC foi de 0,451 no gráfico relacionado aos dados do fabricante A (Figura 15 a); valor este muito próximo ao valor obtido no gráfico do INCQS, que foi de 0,42 (Figura 15 b).

O percentual de valores além dos limites de controle foi maior que o encontrado no ano anterior.

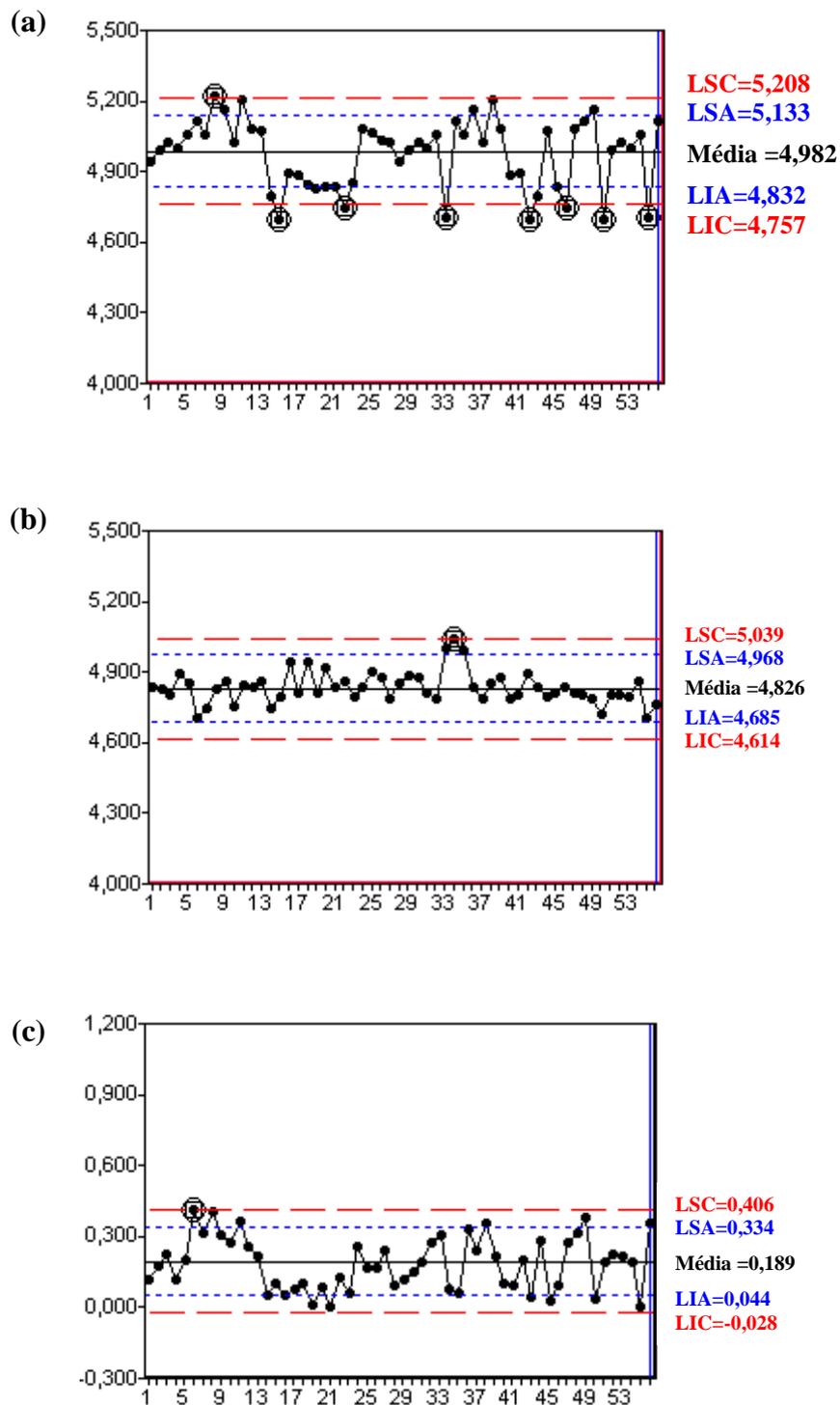


Figura 15: Resultados de potência do fabricante A (a), do INCQS (b) e diferença (c) dos resultados dos lotes analisados em 2006

LSC – limite superior de controle; LSA – limite superior de alerta; LIA – limite inferior de alerta; LIC – limite inferior de controle

No ano de 2007, 16 valores de potência fornecidos pelo fabricante, dentre os 62 lotes analisados encontravam-se abaixo do limite inferior de controle, limites maiores que nos anos de 2005 e 2006, de acordo com o demonstrado na Figura 16 a. Esses valores representam um percentual de 25%. Diferentemente, com relação aos valores de potência do INCQS (Figura 16 b), apenas 2 valores estavam abaixo do LIC, representando um percentual de apenas 3,12%. A diferença entre o LSC e o LIC do gráfico que mostra os valores de potência do fabricante foi 0,577, aproximadamente o dobro da encontrada pelo INCQS (0,275).

Pode-se observar ainda que os valores além dos limites encontram-se concentrados na segunda metade do gráfico. Nesse período houve uma maior necessidade de imunização da população com vacinas contra febre amarela pelo PNI, devido ao aumento do número de casos da doença no Brasil e em alguns países da América do Sul. Essa necessidade de maior agilidade na produção e liberação dos lotes pode ter levado a alterações no processo que representaram causas especiais de variação, porém estes valores encontram-se satisfatórios e de acordo com o preconizado na Farmacopéia Brasileira. Entretanto, no INCQS poucos valores se encontravam fora dos limites, sugerindo que a necessidade de liberação de lotes em menor tempo não interferiu no processo da mesma maneira.

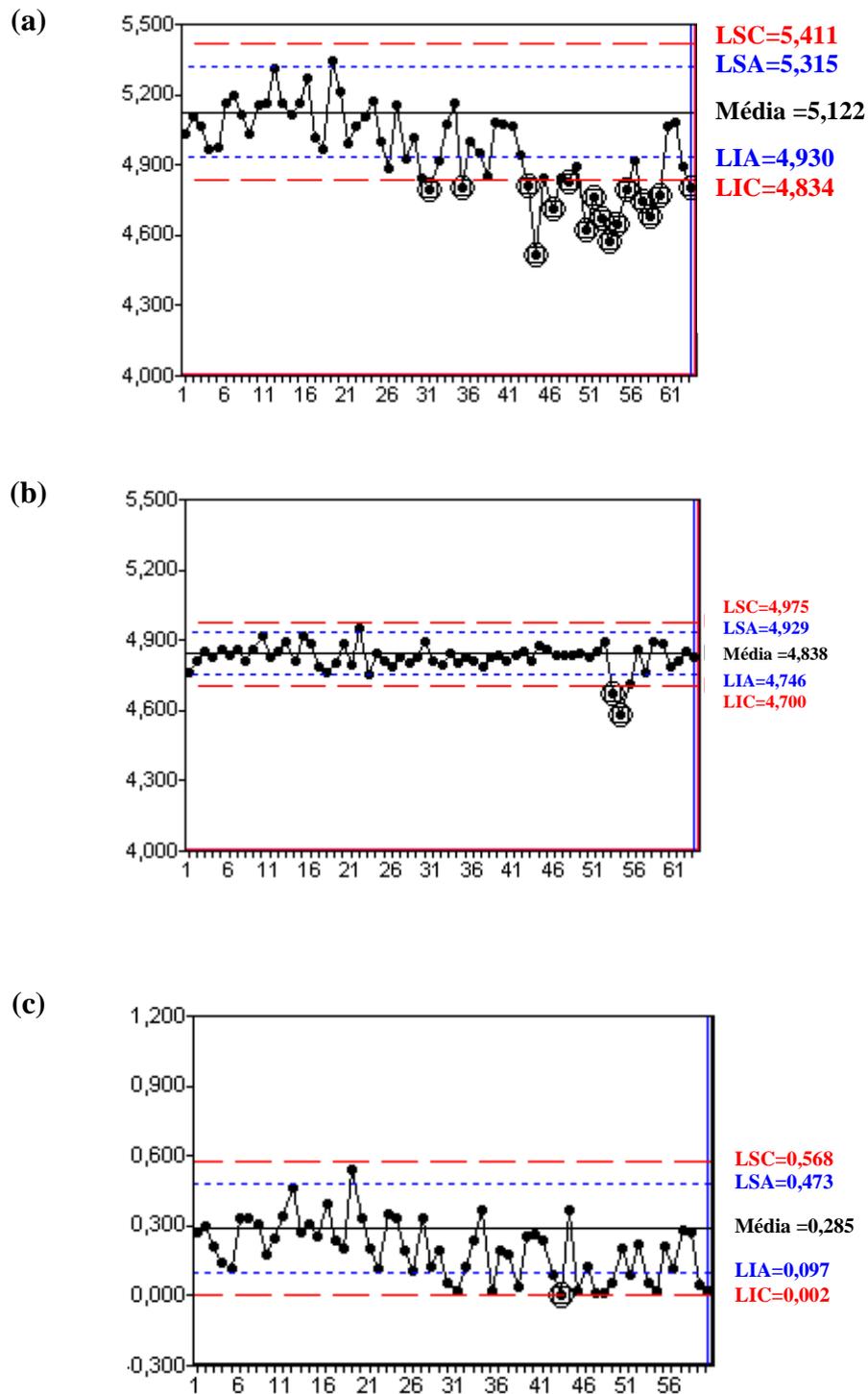


Figura 16: Resultados de potência do fabricante A (a), do INCQS (b) e diferença (c) dos resultados dos lotes analisados em 2007

LSC – limite superior de controle; LSA – limite superior de alerta; LIA – limite inferior de alerta; LIC – limite inferior de controle

No ano de 2008, somente 1 dentre os 57 valores (1,75%) de potência fornecidos pelo fabricante encontrava-se abaixo do limite inferior de controle (Figura 17 a). Já no INCQS (Figura 17 b) podemos observar que 2 valores encontravam-se abaixo do limite inferior de controle (3,50%). A Figura 17 c, que representa a diferença do valor de potência entre o fabricante e o INCQS para cada lote, mostra um único valor fora do limite.

A diferença entre os LSC e LIC do gráfico de controle do fabricante foi de 0,697, aproximadamente o dobro do encontrado pelo INCQS (0,362). Esses resultados sugerem que - por mais uma vez - o processo de controle no INCQS apresentou menor variação que o laboratório de controle do fabricante.

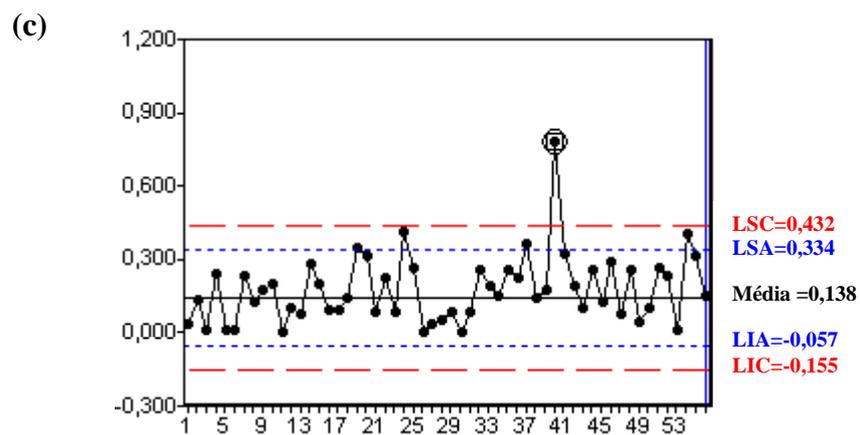
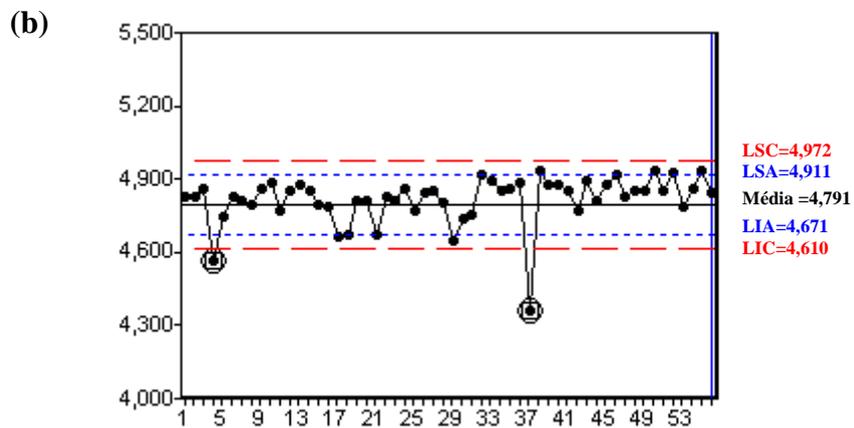
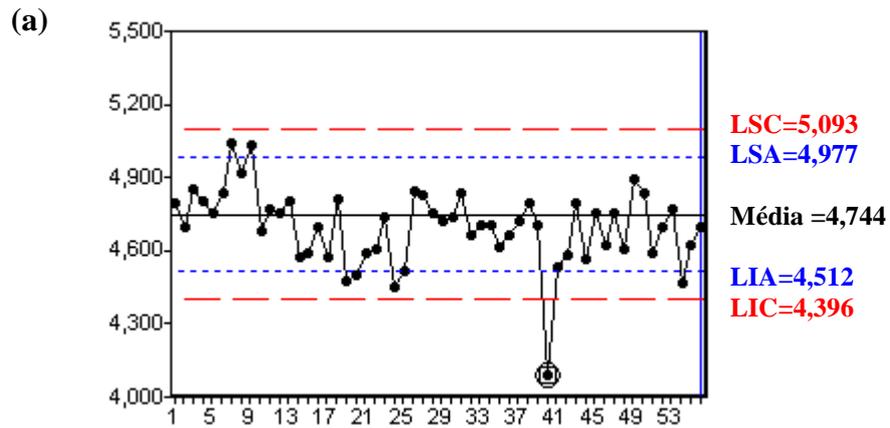


Figura 17: Resultados de potência do fabricante (a), do INCQS (b) e diferença dos resultados dos lotes analisados em 2008

LSC – limite superior de controle; LSA – limite superior de alerta; LIA – limite inferior de alerta; LIC – limite inferior de controle

As Figuras 18, 19, 20 e 21 mostram os valores do teste de termoestabilidade fornecidos pelo fabricante e pelo INCQS. De maneira geral, observou-se que os valores de termoestabilidade tiveram menos variação que os de potência.

No ano de 2005 (Figura 18 a) um valor dentre um total de 127 lotes analisados pelo fabricante estava fora dos limites, o que representa um percentual de apenas 0,79%. A Figura 18 b e a Figura 18 c não apresentaram nenhum valor fora dos limites de controle. A diferença entre o LSC e LIC do gráfico (0,921) dos valores do fabricante (Figura 18 a) foi quase 3 vezes maior que a obtida pelo INCQS (0,377), Figura 18 b. Esses resultados sugerem que o processo de controle de termoestabilidade nesse ano apresentou menor variação no INCQS que no fabricante.

A Figura 19 mostra os resultados do teste de termoestabilidade do fabricante (Figura 19 a) e do INCQS (Figura 19 b) no ano de 2006, onde valores fora dos limites de controle foram encontrados apenas na Figura 19 a. O percentual de valores fornecidos pelo fabricante fora dos limites de controle foi de 5,30%. A Figura 19 c mostra a diferença dos valores de termoestabilidade entre o fornecido pelo fabricante e o obtido pelo INCQS e aponta um valor fora dos limites. Esse achado é esperado, considerando que o processo no INCQS apresenta menor variação e grande diferença ao considerarmos os limites de controle dos dois laboratórios.

A diferença entre os limites de controle (LSC e LIC) foi de 0,627 para o fabricante e de 0,378 para o INCQS. Como observado anteriormente, esses achados indicam que o processo de controle de termoestabilidade apresentou maior variação no fabricante, também no ano de 2006, quando comparado com os resultados obtidos pelo INCQS no mesmo ano.

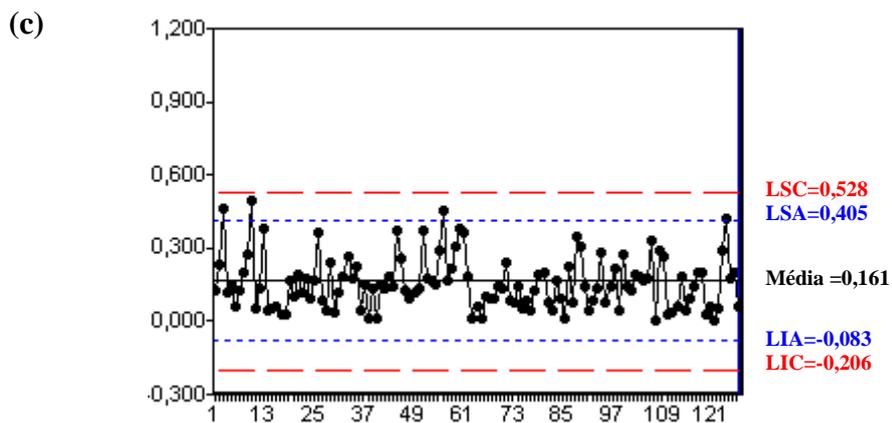
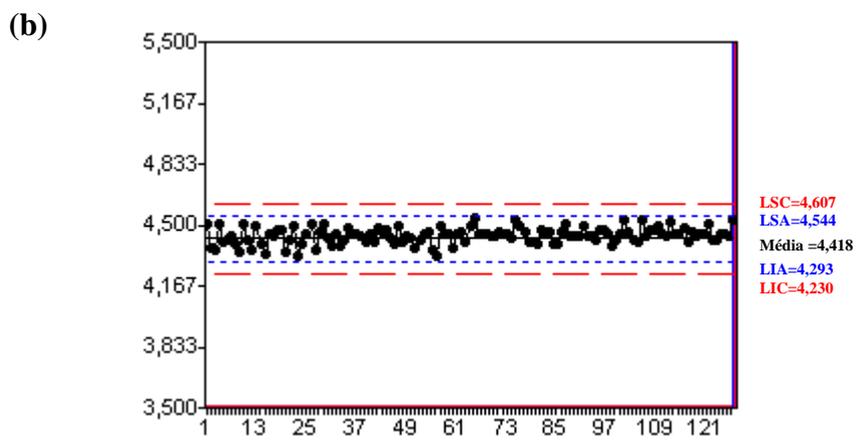
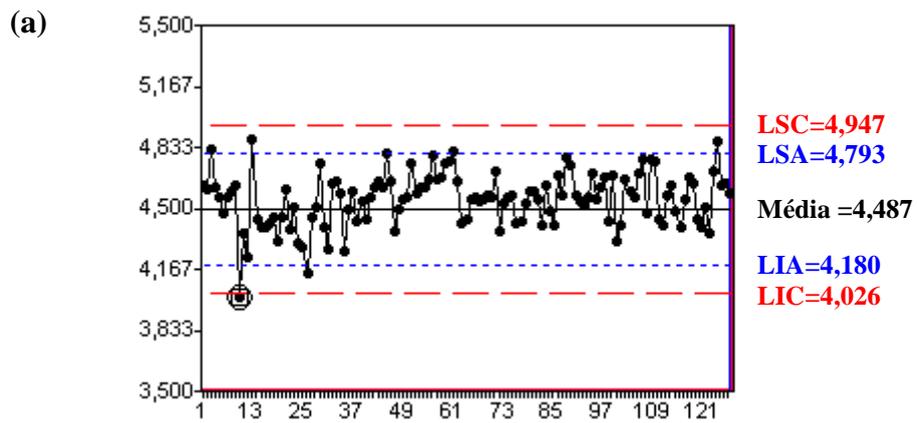
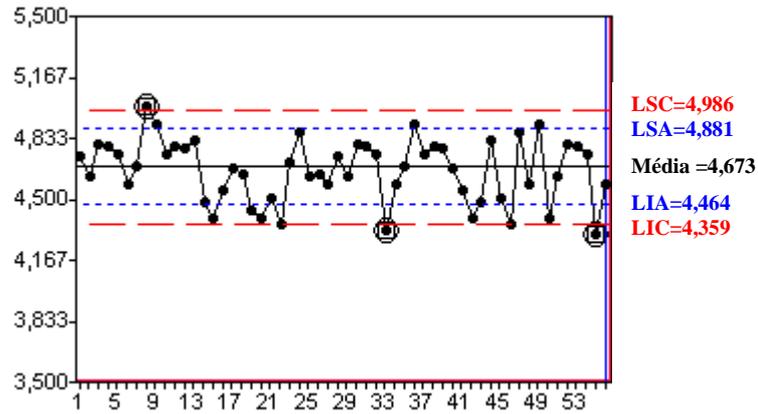


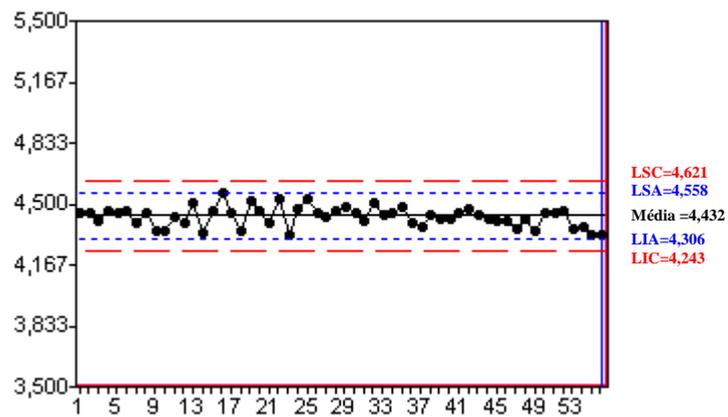
Figura 18: Resultados de termoeestabilidade do fabricante A (a), do INCQS (b) e diferença dos resultados dos lotes analisados em 2005

LSC – limite superior de controle; LSA – limite superior de alerta; LIA – limite inferior de alerta; LIC – limite inferior de controle

(a)



(b)



(c)

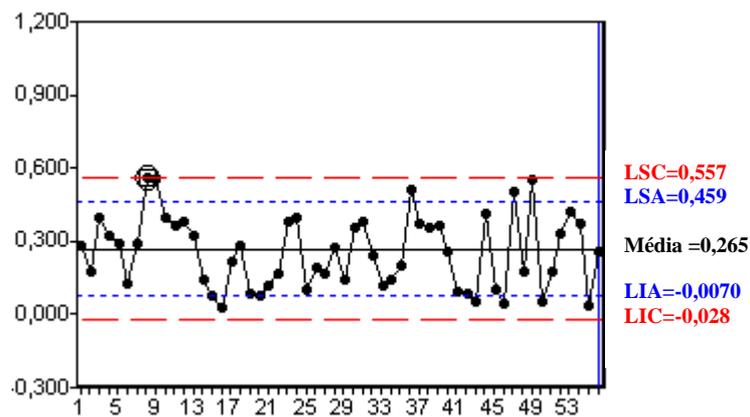


Figura 19: Resultados de termoestabilidade do fabricante A (a), do INCQS (b) e diferença dos resultados dos lotes analisados em 2006

LSC – limite superior de controle; LSA – limite superior de alerta; LIA – limite inferior de alerta; LIC – limite inferior de controle

Em 2007, o gráfico de termoestabilidade do fabricante não apresentou valores fora dos limites (Figura 20 a). Um único valor dentre os 60 obtidos pelo INCQS encontrou-se fora do limite superior, perfazendo um total de 1,67%. Apesar disso, a diferença entre os limites de controle do fabricante foi de 0,903 e o do INCQS foi apenas de 0,278. Dessa maneira, ainda é possível afirmar que no INCQS o processo apresenta maior homogeneidade e que o valor que extrapolou os limites ocorreu por alguma causa especial de variação, aparentemente contornada logo a seguir.

Na Figura 21, referente ao ano de 2008, que mostra os valores do fabricante, e na Figura 21 b, do INCQS, nenhum valor de termoestabilidade encontrou-se fora dos limites de controle. Ainda assim, é importante destacar que a diferença dos limites foi de 1,158 para o fabricante e de apenas 0,559 para o INCQS.

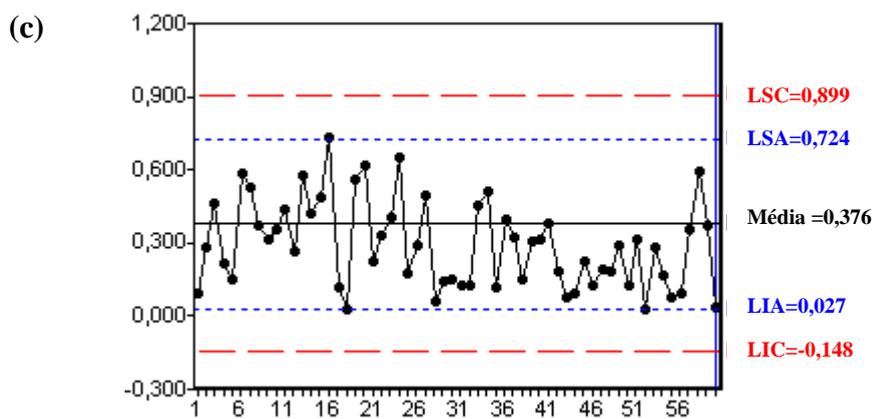
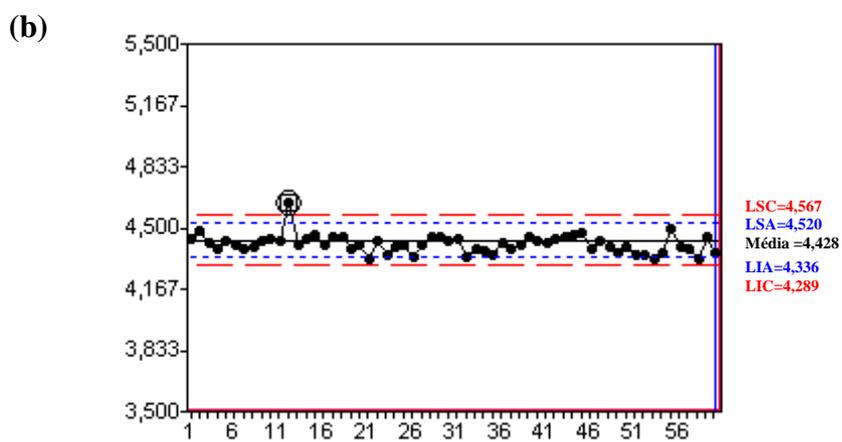
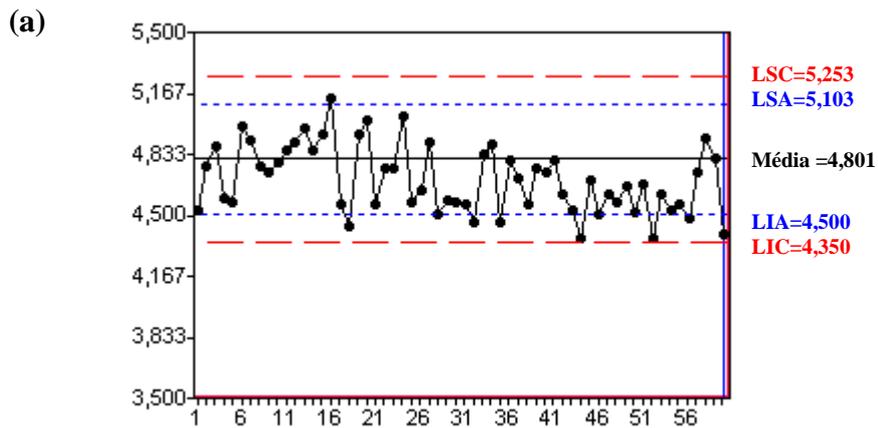


Figura 20: Resultados de termoestabilidade do fabricante A (a), do INCQS (b) e diferença dos resultados dos lotes analisados em 2007

LSC – limite superior de controle; LSA – limite superior de alerta; LIA – limite inferior de alerta; LIC – limite inferior de controle

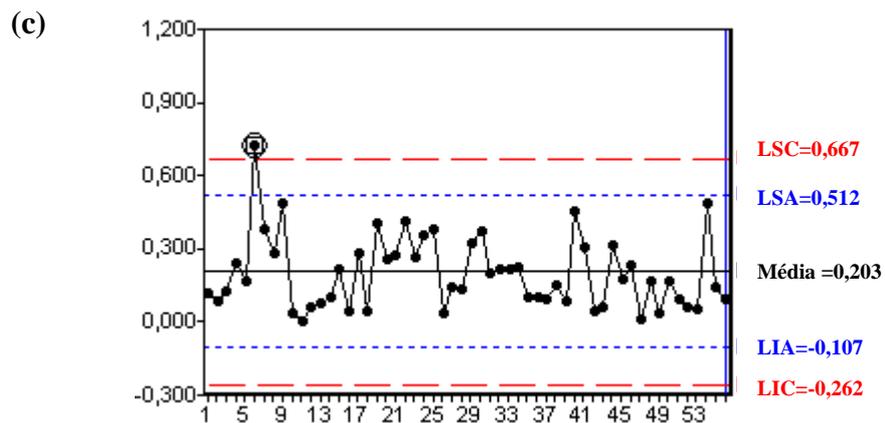
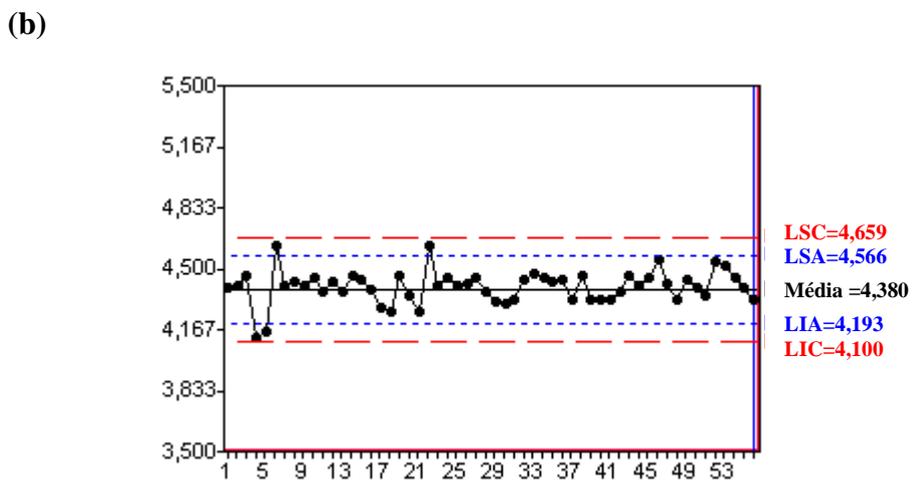
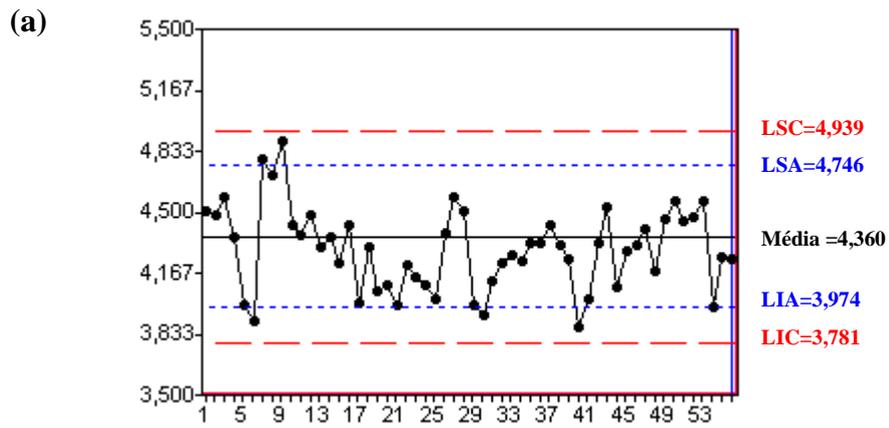


Figura 21: Resultados de termoestabilidade do fabricante A (a), do INCQS (b) e diferença dos resultados dos lotes analisados em 2008

LSC – limite superior de controle; LSA – limite superior de alerta; LIA – limite inferior de alerta; LIC – limite inferior de controle

A avaliação dos gráficos de controle de potência e de termoestabilidade permite concluir que o processo no INCQS apresentou menor variação que no laboratório de controle do fabricante A. Nesse caso, o processo está sob controle estatístico e as causas especiais de variação estão sendo controladas.

A OMS preconiza ainda que os laboratórios de controle acompanhem os resultados obtidos através do uso de materiais de referência, de modo a identificar variações no processo que, conseqüentemente, podem interferir diretamente no cálculo de potência dos lotes analisados. Dessa maneira, acompanhamos o desempenho da vacina de referência de febre amarelo, conforme as seções a seguir.

4.5 Controle de potência e termoestabilidade da vacina de febre amarela no INCQS

4.5.1 Acompanhamento da vacina de referência de febre amarela

Os gráficos de controle são utilizados também como ferramenta para o controle do material de referência e sempre que um valor ultrapassar os limites de controle (3 desvios-padrão) o resultado é considerado inválido e as amostras devem ser retestadas.

Os resultados obtidos com a vacina de referência de febre amarela (lote 003) foram utilizados para a confecção de gráficos de controle para cada ano estudado (Figura 22).

No ano de 2005 um único valor encontrava-se fora dos limites de controle. Dessa maneira, esse ensaio foi considerado inválido e repetido posteriormente. Já nos anos de 2006 a 2008, nenhum resultado foi considerado inválido por esse critério. Esses resultados demonstram que o teste de controle de potência no INCQS encontra-se sob controle estatístico e que as causas especiais de variação, caso ocorram, são devidamente identificadas e contornadas.

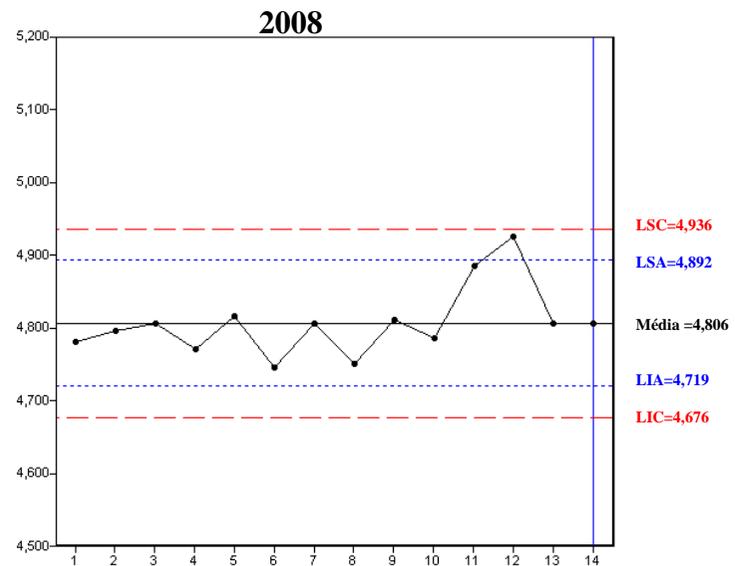
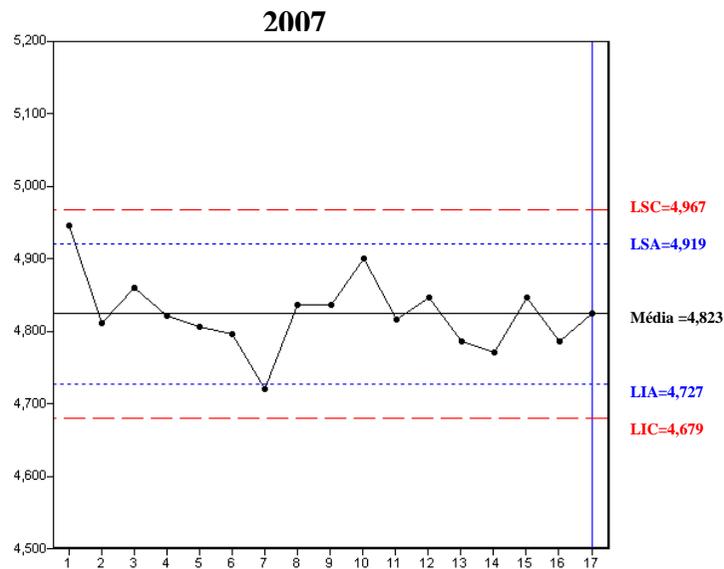
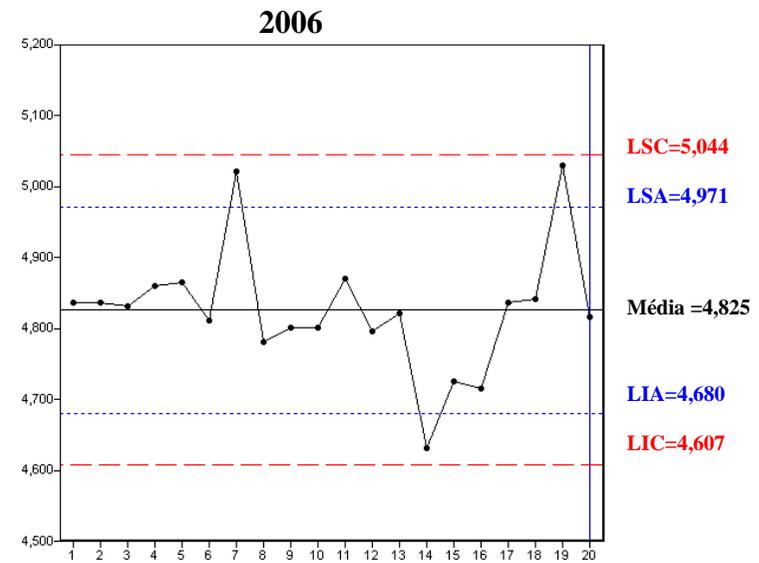
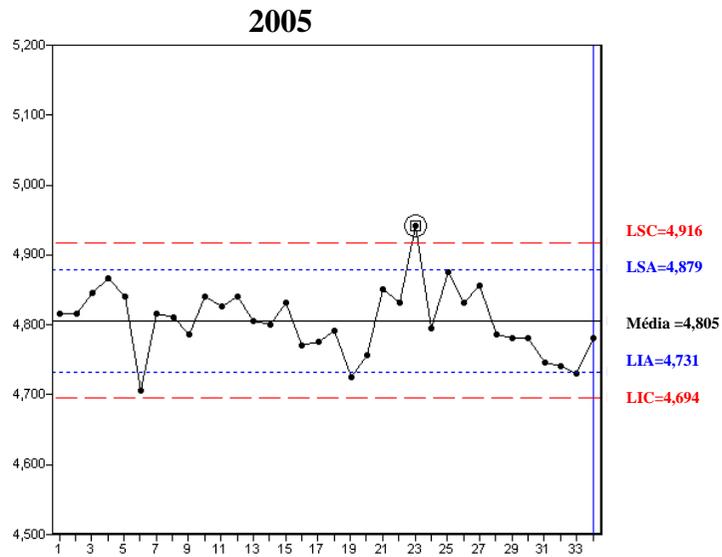


Figura 22: Gráficos de controle dos valores obtidos pela vacina de referência (003) no laboratório de controle do INCQS

LSC – limite superior de controle; LSA – limite superior de alerta; LIA – limite inferior de alerta; LIC – limite inferior de controle

4.5.2 Validação do teste de potência da vacina contra febre amarela no INCQS

O controle da qualidade de um imunobiológico deve ser realizado por testes farmacopéicos ou devidamente validados. O controle de potência da febre amarela é realizado como preconizado na Farmacopéia Brasileira e por isso, *a priori*, não precisa ser validado. Entretanto, consideramos ser necessário a realização de uma validação interna (*in house*) do método nos laboratórios de controle.

Dessa maneira, um estudo de validação do ensaio de UFP para vacina contra febre amarela foi realizado utilizando dados de ensaios realizados no INCQS para liberação de lotes da vacina comercial para utilização no PNI. O objetivo primário foi estabelecer especificação para a realização do ensaio e validar o ensaio através da demonstração de sua confiabilidade (variabilidade ou imprecisão), Exatidão (%Bias e %Recuperação), Repetitividade (variação intra-ensaio) e Precisão intermediária (variações inter-ensaio e inter-analista).

Os resultados obtidos foram:

- a) Exatidão: bias (média título obtido – título esperado) = 0,19 (0,09 – 0,25) e %Recuperação = 96,14% (100 x [média título obtido/título esperado])
- b) Precisão:
 - Repetitividade: geral (variação intra-ensaio) 11,92% (3,53 – 18,47)
 - Precisão intermediária
 - Variação Inter-ensaios = 7,78%
 - Variação Inter-analistas = 7,8%
 - Variação analista A = 7,63%
 - Variação analista B = 8,22%

→ Precisão total: 14,48%

Vale destacar que os valores obtidos para precisão encontram-se dentro dos critérios preconizados para ensaios biológicos pelas normas oficiais (US FDA-CBER, 1997 ; AOAC, 2000), *i.e.* CV% abaixo de 20%.

4.6 Considerações finais

A OMS recomenda o uso de gráficos de controle com limites de confiança de três desvios-padrão para o acompanhamento dos materiais de referência, da análise de tendências e da consistência de produção (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1997; 2009).

4.6.1 Acompanhamento de materiais de referência

Durante a realização de testes para determinação da potência de soros e vacinas são utilizados materiais de referências devidamente certificados e aferidos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1997; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009). Além de serem utilizados para o cálculo da potência dos produtos, é possível realizar comparações entre diferentes laboratórios, como entre o controlador nacional e o fabricante (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009). Nossos resultados confirmam a importância da confecção de gráficos de controle como ferramenta para monitorar os materiais de referência ao longo do tempo e detectar variações no processo e tendências nos resultados (MURRAY, 1997). Essas variações podem ocorrer tanto por alteração da atividade do material de referência como do próprio método ou de outros fatores envolvidos, como linhagens celulares, animais, reagentes e subjetividade dos desfechos relacionados aos testes empregados (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009). Os gráficos de controle também podem ser considerados critérios de validação para os testes ao se determinar limites de *performance*, como intervalos de confiança de 95%, *i.e.* 3 desvios-padrão (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1997; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009).

4.6.2 Análise de tendências

Os gráficos de controle permitem ainda determinar se o processo é estável e previsível. A análise de nossos resultados indica que o uso desta ferramenta para o acompanhamento de um determinado processo representa uma importante melhoria no sistema avaliado. Para isso, a interpretação adequada dos gráficos de controle e a tomada de decisão são cruciais e devem ser realizadas em tempo real, ou seja, assim que o resultado for obtido deve ser imediatamente lançado no gráfico e este, devidamente interpretado. Além disso, os gráficos de controle podem evitar que dois tipos de erro sejam cometidos: o supercontrole ou o sub-controle. O

primeiro refere-se à ação indevida quando não ocorreu alteração no processo e o segundo, à falta de ação, quando ela seria necessária.

Os resultados que compõem os gráficos são - via de regra - submetidos a testes de *performance* (MURRAY, 1997). Dependendo do teste e do resultado, recomenda-se o aumento da supervisão ou invalidação do teste. Quando o controlador analisa os resultados do fabricante é possível averiguar se ocorreram mudanças no processo e prevenir até futuras reprovações de lotes. Além disso, a análise desses gráficos pode auxiliar na condução de auditorias nos produtores.

4.6.3 Acompanhamento da consistência de produção

Além dos testes analítico-laboratoriais e análise documental para verificação dos critérios preconizados pelas normas oficiais para os produtos imunobiológicos, os laboratórios nacionais de controle podem e devem realizar a análise da consistência de produção lote a lote. No caso do estudo em questão, essa análise consistiu da confecção de gráficos de controle com os resultados de potência obtidos pelo fabricante A (informados no protocolo resumido de produção e controle de cada lote), pelo INCQS e ainda da diferença de resultados obtidos pelo produtor e pelo controlador.

Conforme mencionado anteriormente, na maioria das vacinas produzidas em sistemas biológicos existem variações inerentes ao processo. Estas podem ser muitos sutis, como por exemplo, uma pequena mudança na qualidade da água. Por isso, todas as fases essenciais na produção de vacinas devem ser rigorosamente checadas e controladas desde o início ao final da produção, dentre elas podemos citar: (i.) fonte qualificada de antígeno, padronizada com potência conhecida, pura, livre de contaminantes, corretamente armazenada e testada; (ii.) cultura de estoque original do antígeno (lote semente), (iii.) substrato, (iv.) sistema de propagação, tais como meios de cultura, cultura celular etc, padronizada, pura, livre de contaminantes corretamente armazenada e testada, ovos embrionados etc.

Quando um produto biológico é fabricado, as características deste produto irão apresentar uma variabilidade inevitável, devido à variação sofrida pelos fatores que compõem o processo produtivo. A vacina contra febre amarela, cuja produção é constituída de vírus vivos atenuados, derivados da linhagem 17D, cultivados em ovos embrionados de galinha, demonstrará também no gráfico de controle variações inerentes. Apesar de um esforço

considerável ser especificamente direcionado para controlar a variabilidade em cada um desses fatores, existirá sempre a variabilidade de cada processo no produto acabado. Portanto, é importante que esta variabilidade também seja controlada, para que cada vez mais sejam fabricados produtos de boa qualidade.

4.6.4 Satisfatoriedade da vacina contra febre amarela

Com relação a satisfatoriedade dos lotes analisados, nosso estudo demonstrou que entre janeiro de 2000 e dezembro de 2008 ingressaram no INCQS 1031 lotes de vacinas contra febre amarela, produzidos por dois fabricantes distintos. 97% dos lotes analisados foram produzidos pelo fabricante A e 3% pelo fabricante B, representando um total de 285 milhões de doses individuais produzidas nesse período para uso pelo PNI. No entanto, desse total, 5 lotes do fabricante A (0,5% do total de lotes deste fabricante) foram considerados insatisfatórios; três lotes insatisfatórios no teste de esterilidade bacteriana e fúngica e dois lotes no teste de umidade residual. Portanto, estes 5 lotes (cerca de 1,7 milhões de doses) foram descartados pelo próprio fabricante, após a emissão do laudo de análise insatisfatório pelo INCQS.

Neste contexto, deve-se enfatizar que, embora o processo de controle da qualidade tenha como objetivo avaliar as especificações definidas em normas oficiais e/ou no registro sanitário, a relação de ensaios preconizados nos compêndios oficiais e portanto conduzidos mundialmente nos laboratórios oficiais de controle da qualidade para fins de liberação de lote de imunobiológicos, **não** apresenta potencial preditivo para detecção de **todo e qualquer tipo de evento adverso**. Alguns destes eventos, aparentemente, estão associados à predisposição genética e só serão detectados em campo, como por exemplo, a doença viscerotrópica aguda. Embora rara, esta enfermidade é - via de regra - muito grave, levando a uma estimativa de risco aproximada de 1 óbito a cada 450.000 doses aplicadas (BRASIL, 2008). Este fato ressalta a necessidade de um sistema de farmacovigilância ágil, seguro e eficiente.

Assim, devemos ainda destacar: (i.) a necessidade da estreita relação entre as esferas de atuação responsáveis pelo “controle da qualidade pré-vacinal” e “farmacovigilância”, (ii) que esta parceria é fundamental para assegurar a qualidade do produto, sob o ponto de vista do seu processo produtivo, e também para prevenir e/ou minimizar a morbidade relacionada a eventos adversos pós-vacinais, e (iii) quanto mais eficiente tal parceria, mais ágeis serão as decisões regulatórias e as intervenções resultantes deste processo. Tal estratégia é essencial

para a garantia do produto final, além de fortalecer os programas oficiais de imunização e torná-los aptos a atenderem efetivamente às necessidades da população, contribuindo como medida pronta, eficaz e segura de promoção da saúde e proteção individual e coletiva.

5. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo nos permitem concluir, que:

1. quanto ao levantamento de dados no Sistema de Gerenciamento de Amostras:

1.a. No período estudado (2000-2008) ingressaram no INCQS 1031 lotes de vacinas contra febre amarela, produzidos por dois fabricantes distintos (97% pelo fabricante A e 3% pelo fabricante B), representando um total de 285 milhões de doses individuais. Desse total, 5 lotes do fabricante A foram considerados insatisfatórios, sendo três lotes no teste de esterilidade bacteriana e fúngica e dois lotes no teste de umidade residual. Ao todo, aproximadamente 1,7 milhões de doses de vacina contra febre amarela foram reprovadas e conseqüentemente inutilizadas pelo fabricante A.

2. quanto à análise dos gráficos de controle:

2.a. A avaliação dos resultados dos testes de potência e de termoestabilidade do INCQS e do fabricante A permite concluir que estes testes apresentam menor variação no INCQS;

2.b. No ano de 2007 foi possível observar um número significativo de valores do teste de potência do fabricante A abaixo do limite inferior de controle. Estes valores concentravam-se na segunda metade do gráfico, coincidindo com um período em que houve uma maior demanda pela vacina contra febre amarela, devido ao aumento no número de casos da doença no Brasil e em alguns países da América do Sul;

2.c. No INCQS, o processo está sob controle estatístico e as causas especiais de variação, caso ocorram, estão sendo controladas;

2.d. Os gráficos de controle aqui utilizados para demonstração do desempenho do processo de produção e controle da qualidade mostraram-se uma ferramenta útil, auxiliando a monitorar os parâmetros de análise crítica e dando maior confiabilidade a respeito dos resultados dos testes de potência e termoestabilidade.

2. quanto à validação retrospectiva do teste de potência contra febre amarela no INCQS:

3.a. A exatidão do teste foi de 0,19 (0,09-0,25), e recuperação de 96,14%;

3.b. A precisão total foi de 14,48%, sendo a repetitividade de 11,92% e precisão intermediária de 7,78% entre ensaios, e 7,80% entre analistas. Estes valores encontram-se satisfatórios e de acordo com o preconizado para ensaios biológicos por agências internacionais como OMS e AOAC.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN ORGANIZATION OF ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 17. ed. Maryland, 2000.
- BARNETT, E.D. Yellow Fever: Epidemiology and Prevention. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p. 850-856. 2007.
- BASCH, P.F. Vaccines and World Health: science, policy and practice. New York: Oxford University Press. Epidemiology and ethics in transferring technology; p. 59-94. 1994.
- BENCHIMOL, Jaime Larry. **Febre amarela: a doença e a vacina, uma história inacabada**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; Bio-Manguinhos. 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de vigilância epidemiológica dos eventos adversos pós-vacinação**. Brasília; 1998.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de vigilância epidemiológica dos eventos adversos pós-vacinação**. 2. ed. Brasília; 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância Epidemiológica de Eventos Adversos Pós-Vacinação**. 2. ed. Brasília, 2008. (Série Manual e Normas Técnicas em Saúde)
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Vigilância Epidemiológica de Febre Amarela**. Brasília, 2004. 69 p
- CDC. Transmission of Yellow Fever Vaccine Vírus through breast-feeding – Brazil, 2009. **MMWR**, v. 12, n. 130-132, 2010.
- CHEN, R.T.; DESTEFANO, F. Vaccine adverse event: causal or coincidental? **Lancet**; v. 351, p. 611-612. 1998.
- CLEMENS, J.D; STANTON, B.F. Longer term evaluation of vaccine efficacy. In: Woodrow GC, Levine MM. **New generation vaccines**. New York: Marcel Dekker Inc, 1990. p.51-65.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Fascículo 3 – 4ª ed. part II – Monografia 124, Vacina de vírus vivos contra febre amarela, 2001.
- FERREIRA, W. & SOUSA, J. **Microbiologia**., Rio de Janeiro: Lidel- edições técnicas Ida, Lousã, 2002. v. 3
- FIGUEIREDO, L.T. Emergent arboviruses in Brazil, **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 40, p. 224–229, 2007.
- FRANCO; O. História da febre amarela no Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 21, p. 317-520, 1969.

FRAZIER J.M., **Scientific criteria for validation of in vitro toxicity tests**. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development, 1990. (OECD Environment Monograph Number 36), p. 1–62.

GALLER, R. et al. Phenotypic and molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil. **Virology**. 2001.

GEMAL, A.L.; LEAL, E.C. Controle de Qualidade dos Imunobiológicos: participação do INCQS. In: BUSS, P.M; Temporão, J.G; Carneiro, J.R. (Org.). **Vacinas, Soros & Imunizações no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2005. p. 131-144.

HENDERSON, D.A.; FENNER, F. Smallpox and vaccinia. In: Plotkin SA, Mortimer EA. **Vaccines**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994. p. 13-40.

HONÓRIO, N.A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Frequência de larvas e pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em armadilhas, Brasil. **Rev Saúde Pública**, v. 35, p.385-91, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 653400002**: gráficos de controle para medidas individuais e amplitudes móveis em ensaios biológicos. Rio de Janeiro, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. Portaria nº 031, de 27 de dezembro de 2002. Define os parâmetros para emissão dos Laudos de Análise (análises de orientação) a serem utilizados nos imunobiológicos referentes a prestação de serviço ao Programa Nacional de Imunizações, coordenado pela FUNASA. Rio de Janeiro, 27 dez. 2002.

KLEIN, J. et al. Validation of Assays for Use with Combination Vaccines. **Biologicals**, v. 27, p. 35–41, 1999.

KITCHENER, S. Viscerotropic and neurotropic disease following vaccination with the 17D yellow fever vaccine, ARILVAX. **Vaccine**, v. 22, p.2103-2105, 2004.

LEVINE, M.M. Vaccines and vaccination in the historical perspective. In: Woodrow GC, Levine MM. **New generation vaccines**. New York: Marcel Dekker INC, 1990. p. 3-17.

MURRAY, R.S. **Probabilidade e estatística**. São Paulo: Mc Graw Hill do Brasil, 1997.

NETTO, E.J.R. et al. **Controle da Qualidade da Vacina Sarampo, Caxumba, Rubéola utilizada no Programa Nacional de Imunizações**, no prelo. 2010

NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES. **Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods**: A Report of the ad hoc Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, NIH Publication No. 97-3981, NIEHS, Research Triangle Park, North Carolina, U.S.A., Disponível em: <http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/about_docs/validate.pdf> Acesso em: 02 dez. 2008.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Supplementary information on vaccine safety: Part 2: Background rates of adverse events following immunization.** Geneva, 2000. p. 7-13

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Expert Committee on Biological Standardization: Forty-sixth Report;** Geneva, 1988. (Technical Report Series nº 872)

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Yellow fever: situation in Africa and South America, 2005. **Weekly epidemiological record**, v. 33, n. 81, p. 317-324, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Yellow fever, Brazil. **Weekly epidemiological record**, v. 7, n. 83, p. 61-68, 2008a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Yellow fever, Paraguay. **Weekly epidemiological record**, v. 12, n. 83, p. 105-108, 2008b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Expert Committee on Biological Standardization. Guidelines for Independent Lot Release of Vaccines by Regulatory Authorities:** Draft – meeting is going to be held in oct-2010. Authorities. Disponível em: <http://www.who.int/entity/biologicals/BS2128_Lot_Release_CLEAN.pdf>. Acesso em: 12 out. 2009.

PLOTKIN, S.L.; PLOTKIN, S.A. A short history of vaccination. In: Plotkin SA, Mortimer EA. **Vaccines**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994. p. 1-11.

RUMO a auto-suficiência: fábrica de vacinas contra a gripe vai gerar economia de R\$ 94 milhões anuais. Pesquisa FAPESP, São Paulo, v. 87, maio 2003. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/index.php?art=2157&bd=1&pg=1&lg=>>>. Acesso em 16/06/2010.

SANTOS, R.C. Updating of the distribution of *Aedes albopictus* in Brazil (1997 - 2002). **Rev Saúde Pública**, v. 37, n. 5, p. 1-4, 2003.

STAMPLES, E.; MONATH, T.P. Yellow fever: 100 years of discovery. **JAMA**, v. 300, n. 8, p. 960-962, 2008.

TEMPORÃO, J.G; NASCIMENTO, M.V.L; MAIA, M.L.S. Programa Nacional de Imunizações (PNI): História, avaliação e perspectivas; In: BUSS, P.M; Temporão, J.G; Carvalheiro, J.R. (Org.). **Vacinas, Soros & Imunizações no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2005. p. 101-123

THACKER, S.B.; BERKELMAN, R.L. Surveillance of Medical Technologies. **J Public Health Policy**. v. 7, n. 1, p. 363-376 1986.

UPPSALA UNIVERSITY, **Sabethes chloropterus Picture**. Disponível em: <<http://www.iee.uu.se/zookol/default.php?type=personalpage&lang=en&id=133>>. Acesso em: 14 fev. 2009.

U.S. FDA, CBER. **Guidance for industry for the evaluation of combination vaccines for preventable diseases: production, testing and clinical studies**, Washington, 1997.

VASCONCELOS, P.F.C. Febre Amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 275-293, 2003.

WALDMAN, E.A. **Vigilância epidemiológica como prática de saúde pública**. 1991. Tese (Doutorado em Saúde Pública)– Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1991.